

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacología (Farmacognosia y  
Farmacología Experimental)**



**Hipertrofia cardiaca experimental: estudio de las corrientes  
iónicas de membrana y efecto cardioprotector del captopril**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ana María Gómez García**

**Directora**

**Carmen Delgado Canencia**

**Madrid**

**ISBN: 978-84-8466-862-6**

**© Ana María Gómez García, 1994**

**TESIS DOCTORAL**

**HIPERTROFIA CARDÍACA EXPERIMENTAL: ESTUDIO DE LAS  
CORRIENTES IÓNICAS DE MEMBRANA  
Y EFECTO CARDIOPROTECTOR DEL CAPTOPRIL**

**ANA MARÍA GÓMEZ GARCÍA**

**DIRECTOR: Dra. C. Delgado Canencia  
Colaborador Científico del C.S.I.C  
Instituto de Farmacología y Toxicología  
Dpto. de Farmacología  
Facultad de Medicina, UCM**

**PONENTE: Dr. José Ángel Fuentes Cubero  
Catedrático de Farmacología  
Dpto. Farmacología  
Facultad de Farmacia, UCM**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
OCTUBRE, 1994**

*A mis padres*

*A Jean-Pierre*



*Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Carmen Delgado, Directora de esta Tesis Doctoral, por la dedicación y consejos que me ha prodigado durante la realización del presente estudio, quien no sólo me ha iniciado en el mundo de la investigación científica, sino que me ha brindado en todo momento su apoyo y comprensión.*

*Quiero agradecer al Prof. Dr. Pedro Lorenzo, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis en el Departamento que él dirige, y al Prof. Dr. Ángel Villar, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la misma Universidad, por haber aceptado que lea la Tesis en el Departamento de su dirección.*

*Debo agradecer al Prof. Dr. José Ángel Fuentes, quien ha aceptado gustoso ser Ponente de esta Tesis, y me ha brindado su ayuda siempre que se la he pedido.*

*Agradezco a la Dra. Amaya Aleixandre, Dr. Miguel Puerro, y la Licenciada Visitación López-Miranda, por su preciada ayuda, gracias a la cual ha sido posible llevar a cabo las mediciones de la presión arterial que hemos utilizado en la presente Tesis. Así como a la Dr. Asunción Colino por su generosa ayuda, que ha permitido medir la osmolaridad de algunas soluciones utilizadas en la preparación de esta Tesis Doctoral.*

*Agradezco a la Unidad 195 del ISERM (Clermont-Ferrand, Francia), que me ha acogido en distintas estancias cortas, y especialmente al Dr. Paco Lorente, Director de esta unidad, al Dr. Jean-Pierre Bénitah y a Jean-Philippe DaPonte, por su inestimable colaboración, que ha contribuido a una parte de esta Tesis.*

*Deseo agradecer especialmente la inestimable ayuda y el apoyo que he recibido en los momentos difíciles de los Dres. Santos Barrigón, Paz Fernández, Ángela Alsasua, Juan Carlos Leza, M<sup>a</sup> Teresa Tejerina, Ramón Ramón, Pilar Mayor, Alfonso Martínez-Conde y a la Licenciada Almudena Saiz.*

*Quiero expresar mi gratitud a M<sup>a</sup> Elena Vicente por su ayuda administrativa, a Rubén Vara, Carlos Menéndez, Manuel Solís, Óscar Grijota y M<sup>a</sup> Luisa Hidalgo por su ayuda técnica y apoyo moral en todo momento.*

*Me gustaría agradecer igualmente a las Dres. Marcela del Río, Lucía Parra, Fernando López Olivia San Martín y Carlos Goicoechea, y a los licenciados M<sup>a</sup> Jesús Ormazábal, M<sup>a</sup> Soledad Alonso y Emilio Ruiz, por su disponibilidad en todo momento.*

*Agradezco al laboratorio Bristol-Myers Squibb por haberme proporcionado generosamente parte del Captopril utilizado en los experimentos de esta Tesis.*

*Finalmente agradezco a la Comunidad de Madrid la concesión de una beca de formación de personal investigador, que me permitió la realización de esta Tesis Doctoral.*

*A todos, mi más sincera gratitud.*

## ÍNDICE

### Página

1.- OBJETIVOS . . . . .	1
2.- INTRODUCCIÓN . . . . .	4
2.1.- Inducción de la hipertrofia cardíaca . . . . .	8
2.1.1.- Implicación del sistema renina-angiotensina . . . . .	12
2.1.2.1.- Efectos cardiovasculares de la angiotensina II . . . . .	17
2.2.- Características del corazón hipertrófico . . . . .	21
2.2.1.- Vasculatura coronaria . . . . .	22
2.2.2.- Alteraciones celulares . . . . .	23
2.2.3.- Contractilidad . . . . .	24
2.2.4.- Alteraciones electrofisiológicas . . . . .	27
2.2.4.1.- Conceptos básicos de electrofisiología cardíaca . . . . .	26
2.2.4.2.- Electrofisiología del corazón hipertrófico . . . . .	50
2.3.- Riesgos asociados a la presencia de hipertrofia . . . . .	55
2.3.1.- Insuficiencia coronaria . . . . .	56
2.3.2.- Arritmias ventriculares . . . . .	57
2.3.3.- Insuficiencia cardíaca congestiva . . . . .	58
2.4.- Tratamiento . . . . .	59
2.4.1.- Inhibidores del enzima de conversión de angiotensina . . . . .	62
2.4.1.1.- Historia . . . . .	62
2.4.1.2.- Clasificación . . . . .	63
2.4.1.3.- Farmacocinética . . . . .	66
2.4.1.4.- Efectos cardioprotectores . . . . .	67
2.4.1.5.- Mecanismo de acción . . . . .	71
2.4.1.6.- Efectos secundarios . . . . .	76
2.4.1.7.- Interacciones . . . . .	78
3.- MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	79
3.1.- Modelo experimental de hipertrofia cardíaca . . . . .	80
3.2.- Técnica de disociación de miocitos cardíacos . . . . .	81
3.3.- Técnicas electrofisiológicas . . . . .	82
3.3.1.- <i>Patch-clamp</i> . . . . .	83
3.3.2.- Equipo utilizado . . . . .	86

3.3.3.- Protocolo experimental . . . . .	87
3.4.- Soluciones empleadas . . . . .	88
3.4.1.- Soluciones externas . . . . .	90
3.4.2.- Soluciones internas . . . . .	91
3.5.- Tratamiento crónico con captopril . . . . .	92
3.5.1.- Medición de la presión arterial . . . . .	92
3.5.2.- Protocolo experimental . . . . .	93
3.6.- Análisis estadístico . . . . .	94
4.- RESULTADOS . . . . .	95
4.1.- Estudio topográfico de los potenciales de acción en células ventriculares procedentes de corazones normales e hipertróficos . . . .	96
4.1.1.- Características macroscópicas . . . . .	96
4.1.2.- Heterogeneidad topográfica de los potenciales de acción . . . .	97
4.1.2.1.- Potenciales de acción en células controles . . . . .	97
4.1.2.2.- Potenciales de acción en células hipertróficas . . . .	101
4.1.3.- Modulación de los potenciales de acción por la hipertrofia . .	102
4.1.4.- Síntesis . . . . .	104
4.2.- Estudio de la corriente lenta de entrada de calcio . . . . .	106
4.2.1.- Resultados macroscópicos . . . . .	106
4.2.2.- Corriente lenta de entrada de calcio . . . . .	106
4.2.3.- Cinética de la $I_{Ca}$ dependiente del voltaje . . . . .	110
4.2.3.1.- Activación en estado estacionario . . . . .	110
4.2.3.2.- Inactivación en estado estacionario . . . . .	112
4.2.4.- Cinética dependiente del tiempo . . . . .	114
4.2.4.1.- Reactivación . . . . .	114
4.2.4.2.- Cursos temporales de activación e inactivación . .	116
4.2.5.- Síntesis . . . . .	119
4.3.- Estudio de la corriente transitoria de salida sensible a la 4-aminopiridina . . . . .	120
4.3.1.- Resultados macroscópicos . . . . .	120
4.3.2.- Corriente transitoria de salida . . . . .	121
4.3.2.1.- $I_0$ en células controles . . . . .	124
4.3.2.2.- $I_0$ en células hipertróficas . . . . .	124

4.3.3.- Cinética de $I_{to}$ dependiente del voltaje . . . . .	126
4.3.3.1.- Activación en estado estacionario . . . . .	126
4.3.3.2.- Inactivación en estado estacionario . . . . .	127
4.3.4.- Cinética de $I_{to}$ dependiente del tiempo . . . . .	131
4.3.4.1.- Curso temporal de activación . . . . .	131
4.3.4.2.- Curso temporal de inactivación . . . . .	134
4.3.5.- Síntesis . . . . .	134
4.4.- Estudio de la relación entre la duración del potencial de acción y las corrientes de calcio y transitoria, en cada célula . . . . .	136
4.4.1.- Resultados macroscópicos . . . . .	137
4.4.2.- Resultados obtenidos en células controles . . . . .	137
4.4.3.- Resultados obtenidos en células hipertróficas . . . . .	142
4.4.4.- Síntesis . . . . .	147
4.5.- Estudio de la corriente de fondo . . . . .	148
4.5.1.- Resultados macroscópicos . . . . .	148
4.5.2.- Soluciones empleadas . . . . .	149
4.5.3.- Corriente de fondo total . . . . .	150
4.5.4.- Corriente de rectificación de entrada . . . . .	155
4.5.5.- Corriente insensible a bario . . . . .	157
4.5.5.1.- Distinción de la corriente insensible a bario de otras corrientes de potasio . . . . .	159
4.5.5.2.- Contribución de la corriente sensible al ácido 9-antraceno carboxílico a la duración del potencial de acción . . . . .	163
4.5.6.- Síntesis . . . . .	165
4.6.- Estudio del efecto directo del captopril en las corrientes de membrana	166
4.6.1.- Efecto sobre la corriente de calcio . . . . .	166
4.6.2.- Efecto sobre la corriente transitoria de salida . . . . .	171
4.6.3.- Efecto sobre la corriente de rectificación de entrada . . . . .	177
4.6.4.- Síntesis . . . . .	177
4.7.- Tratamiento crónico con captopril . . . . .	178
4.7.1.- Estudios preliminares . . . . .	178
4.7.2.- Tratamiento crónico . . . . .	180

4.7.3.- Resultados macroscópicos . . . . .	182
4.7.4.- Características de la corriente transitoria de salida . . . . .	184
4.7.4.1.- Dosis no hipotensora . . . . .	184
4.7.4.2.- Dosis hipotensora . . . . .	188
4.7.5.- Síntesis . . . . .	192
5.- DISCUSIÓN . . . . .	193
5.1.- Heterogeneidad en la duración del potencial de acción en el ventrículo izquierdo y su modulación por la hipertrofia . . . . .	195
5.2.- Corriente lenta de entrada de calcio en miocitos cardíacos controles e hipertróficos . . . . .	199
5.3.- Corriente transitoria de salida en miocitos cardíacos controles e hipertróficos . . . . .	203
5.4.- Contribución de las corrientes de calcio y transitoria a la duración del potencial de acción en cada célula . . . . .	206
5.5.- Corriente de fondo en miocitos cardíacos controles e hipertróficos . . . . .	209
5.5.1.- Corriente de fondo total y sensible a bario ( $I_{K1}$ ) . . . . .	210
5.5.2.- Corriente insensible a bario . . . . .	212
5.6.- Efecto del captopril . . . . .	215
6.- CONCLUSIONES . . . . .	220
7.- BIBLIOGRAFÍA . . . . .	223

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>9-AC</b>	Ácido 9-antracenocarboxílico
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AT</b>	Angiotensina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosofato
<b>BK</b>	Bradiquinina
<b>C<sub>m</sub></b>	Capacitancia de membrana
<b>DEM</b>	Desviación estándar de la media
<b>DIDS</b>	Ácido 4,4' diisotiocianatoestilbeno 2,2' disulfónico
<b>DOCA</b>	Deoxicortecosterona
<b>DPA</b>	Duración del potencial de acción
<b>ECA</b>	Enzima de conversión de angiotensina
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol bis NNN'N' tetraacético
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroxietyl] piperazina N-[2-etansulfónico]
<b>I<sub>Ca</sub></b>	Corriente de calcio
<b>I<sub>K</sub></b>	Corriente potásica retardada
<b>I<sub>K1</sub></b>	Corriente de rectificación de entrada
<b>I<sub>K(ACH)</sub></b>	Corriente de potasio de salida activada por la acetilcolina
<b>I<sub>K(ATP)</sub></b>	Corriente de potasio activada por un descenso en el ATP intracelular
<b>I<sub>K(FA)</sub></b>	Corriente de potasio activada por ácidos grasos
<b>I<sub>K(Na)</sub></b>	Corriente de salida de potasio activada por sodio intracelular
<b>I<sub>Kp</sub></b>	Corriente de potasio en la meseta del potencial de acción
<b>I<sub>to</sub></b>	Corriente transitoria de salida
<b>I<sub>to(Ca)</sub></b>	Corriente transitoria de salida dependiente del calcio intracelular
<b>IECA</b>	Inhibidores del enzima de conversión de angiotensina
<b>N.S.</b>	No significativo
<b>PA</b>	Potencial de acción
<b>SRA</b>	Sistema renina-angiotensina

## **1.- OBJETIVOS**

---

---

Una de las múltiples consecuencias de la hipertensión arterial crónica es la aparición de hipertrofia ventricular izquierda, la cual está asociada a un aumento de mortalidad, independientemente de otros factores de riesgo conocidos (Kannel y cols, 1987; Weber, 1988; Kannel y Cobb, 1992). Aunque es un hecho probado que las células procedentes de corazones hipertróficos muestran alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales (Rappaport y cols., 1986), los mecanismos celulares implicados en el proceso de la hipertrofia no son bien conocidos. Desde un punto de vista electrofisiológico, se ha demostrado en diferentes especies, que la duración del potencial de acción cardíaco registrado en corazones hipertróficos es significativamente mayor que en corazones normales (Aronson, 1980; Aronson y Nordin, 1984; Thollon y cols., 1989; Nordin y cols., 1989). Esta prolongación de la duración del potencial de acción sugiere que los canales de calcio y/o potasio podrían estar alterados durante el proceso de hipertrofia. Sin embargo, hasta la fecha en que se empezó la presente Tesis Doctoral, no existía ninguna publicación que demostrara inequívocamente la relación entre el aumento de la duración del potencial de acción observado en el proceso de hipertrofia y la alteración de una determinada corriente iónica.

Además, estudios realizados en diferentes especies han demostrado que existe una heterogeneidad en la duración de los potenciales de acción cardíacos de las células ventriculares (Antzelevitch y cols., 1991; Watanabe y cols., 1983), el conocimiento de las diferencias electrofisiológicas que existen entre células de diferente localización, dentro de un mismo corazón, es de vital importancia para el mejor entendimiento del funcionamiento cardíaco normal y de las arritmias cardíacas, así como para una utilización más racional de los fármacos antiarrítmicos (Antzelevitch y cols., 1991). Si un fármaco actúa sobre una corriente iónica que es más importante en una zona que en otra, el efecto será distinto o de distinta potencia en diferentes regiones de un mismo corazón. Este hecho es de vital importancia y hasta el momento en que empezó esta Tesis, no se conocía con certeza qué corrientes iónicas eran las responsables de la heterogeneidad en la duración del potencial de acción encontrada en el ventrículo izquierdo, ni si se mantiene o se altera en los corazones hipertróficos.



Por otro lado, se sabe que la hipertrofia cardíaca puede ser reversible, evitando de esta manera los riesgos asociados a esta alteración. En pacientes hipertensos, los inhibidores del enzima de conversión de angiotensina (captopril, enalapril, etc) son capaces, no sólo de reducir la presión arterial, sino también de producir una regresión de la hipertrofia (Pfeffer, y cols., 1982; Hodsman y cols., 1988; Eichstaedt y cols., 1989), incluso a dosis que no disminuyen la presión arterial (Linz y cols., 1989a). Este doble efecto es de gran interés, ya que la regresión de la hipertrofia ventricular puede ser decisiva para reducir las demandas miocárdicas de oxígeno o las arritmias cardíacas y prevenir las complicaciones de la hipertensión. El mecanismo por el que los inhibidores del enzima de conversión ejercen este efecto cardioprotector, parece ser consecuencia de su capacidad para inhibir la síntesis cardíaca de angiotensina II (Dzau, 1987; Johnston y cols., 1991; Schölkens y Linz, 1990). En este sentido, hay que indicar que es un hecho probado que la síntesis y liberación de angiotensina II a nivel cardíaco contribuye a la propia regulación cardiovascular. Más aún, es conocido el papel de la angiotensina II como factor trófico, es decir como factor de crecimiento o modulador del crecimiento (Schelling y cols., 1991).

Por todo lo anterior, en la presente Tesis Doctoral nos proponemos estudiar las corrientes iónicas implicadas en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco en la rata, tanto en diferentes partes del ventrículo normal (para determinar qué corrientes están implicadas en la heterogeneidad del potencial de acción) como del hipertrófico (para determinar qué corrientes son responsables de la prolongación del potencial de acción de estas células). Del mismo modo, nos proponemos estudiar la acción de un inhibidor del enzima de conversión (el captopril), tanto el posible efecto directo sobre las corrientes iónicas, como en tratamiento crónico, para evaluar la posible prevención del desarrollo de la hipertrofia cardíaca. En el tratamiento crónico, intentaremos separar los efectos puramente hemodinámicos utilizando una dosis hipotensora, de los debidos a una disminución de la angiotensina II, utilizando una dosis no hipotensora pero que sea capaz de inhibir el enzima de conversión. Después del tratamiento crónico con ambas dosis de captopril, estudiaremos electrofisiológicamente las células aisladas de estos corazones, para comprobar si desde este punto de vista se pueden considerar normales.

## **2.- INTRODUCCIÓN**

---

---

La hipertrofia cardíaca es un incremento en la masa cardíaca en relación al peso corporal. Frecuente en un gran número de enfermedades cardiovasculares (se ha encontrado en aproximadamente el 50% de los pacientes hipertensos) es esencialmente la expresión de una adaptación del corazón en respuesta a una situación, generalmente patológica, en la cual el miocardio debe ejercer durante tiempo prolongado un trabajo mayor de lo normal para satisfacer las necesidades del organismo (Coraboeuf, 1992).

Aunque la hipertrofia cardíaca fue descrita por Hallopeau en 1869, permaneció prácticamente olvidada hasta finales de los años 50, justo después de que se desarrollara la cirugía a corazón abierto. A partir de ahí el conocimiento de esta cardiomiopatía fue creciendo rápidamente y tomó más importancia al ver que con frecuencia terminaba en muerte súbita: se ha demostrado que pacientes con hipertrofia cardíaca tienen un riesgo cinco veces mayor de muerte súbita (Kannel y cols. 1969 y 1975; Kannel, 1974). También se la ha asociado con infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva.

La estructura cardíaca no sólo está influenciada por un aumento en la carga hemodinámica, sino también por distintos factores neurohumorales, incluyendo el sistema renina-angiotensina, la estimulación  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgica, y la tiroxina. Un incremento en la postcarga ventricular, un daño ventricular agudo o crónico y una estimulación de los sistemas neurohormonales, promueven el desarrollo de una hipertrofia ventricular izquierda, aumentando la función sistólica de este ventrículo a corto y medio plazo. Sin embargo, a largo plazo, el fallo en la función diastólica, la necrosis de los miocitos, fibrosis y el agotamiento energético conducen a una insuficiencia cardíaca.

Los cardiomiocitos se hipertrofian en respuesta a un incremento en la tensión de las paredes del ventrículo. Esta hipertrofia individual de los miocitos, conduce a una hipertrofia del ventrículo que normaliza la tensión que soporta, según la ley de Laplace ( $T = P \cdot r / 2 L$ , donde T es la tensión de la pared ventricular, P es la presión, r es el radio ventricular, y L el espesor de la pared ventricular). El incremento en la tensión es un estímulo directo que produce hipertrofia, tanto en preparaciones tisulares aisladas (Kent y cols., 1989), como en corazones intactos (Kira y cols., 1984).

Este incremento en la demanda de trabajo cardíaco puede ser debida a un aumento en la presión y/o en el volumen sanguíneo. En el hombre, la hipertrofia cardíaca puede estar provocada por una hipertensión arterial, por insuficiencia valvular, o por otras causas entre las que se encuentran ejercicio físico, anemia, hipertiroidismo, hipoxia, pérdida regional de tejido funcional (infarto), etc. También se ha relacionado la obesidad y el consumo de alcohol con un incremento en la masa cardíaca (Lauer y cols., 1991; Manolio y cols., 1991)

A partir del momento en que el corazón está sometido a un esfuerzo mayor de lo normal, va manifestando distintos cambios que se podrían dividir en tres fases (Meerson, 1969; Weber, 1988; Katz, 1988 y 1990). La primera fase o desarrollo comienza cuando se presenta la causa que exige al corazón mayor trabajo. En respuesta a una sobrecarga hemodinámica, la hiperfunción del miocardio puede mantener un estado inicial de compensación limitada. Durante este estado, el flujo coronario y el consumo de oxígeno está aumentado en proporción a la sobrecarga. Sin embargo, se trata de un estado inestable y está marcado por un aumento en la síntesis de ADN, ARN y proteínas que lleva al crecimiento del tejido miocárdico. Así llegamos a la fase 2 ó hipertrofia compensada. En este momento la hipertrofia se ha instaurado y de esta forma, al incrementar el número de sarcómeras, el corazón puede responder a la demanda de trabajo mediante una hiperfunción estable adaptándose a la nueva situación (los síntomas que se presentan en esta y en las demás fases se resumen en la tabla 1). Aunque la respuesta hipertrófica es adaptativa e inicialmente ayuda al corazón a enfrentarse con la nueva situación, no termina bien, en la fase tercera, a consecuencia de la hiperfunción sostenida, el corazón se va agotando, degenera y se debilita, rompiéndose la compensación y desencadenando una insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la hipertrofia sólo proporciona compensación por un cierto tiempo y a largo plazo el corazón degenera, se debilita y se rompe la compensación.

**Tabla 1:** Síntomas de distintas fases de la hipertrofia cardíaca a distintos niveles.

FASE	CIRCULACIÓN	CORAZÓN	MIOCITOS CARDÍACOS
DESARROLLO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fallo cardíaco agudo</li> <li>- Congestión pulmonar</li> <li>- Menor eyección de sangre por el corazón</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilatación ventricular aguda</li> <li>- Hipertrofia temprana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento en la densidad de mitocondrias en relación a las miofibrillas</li> </ul>
HIPERTROFIA COMPENSADA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Descenso de la congestión pulmonar</li> <li>- Aumento de la eyección de sangre por el corazón</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipertrofia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de la densidad de miofibrillas en relación a las mitocondrias</li> </ul>
HIPERTROFIA DESCOMPENSADA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuficiencia cardíaca progresiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipertrofia más acusada con fibrosis progresiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muerte celular</li> </ul>

Modificado de Meerson, 1969.

## 2.1.- INDUCCIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA

Se ha identificado a la sobrecarga hemodinámica como un factor clave que regula el crecimiento del corazón. Cualquier cambio en las demandas del corazón, ya sea por causa fisiológica o patológica, conduce a una alteración en la relación peso cardíaco/peso corporal que difiere de la normal. El incremento en el tamaño del corazón es lo que se conoce como hipertrofia cardíaca. Sin embargo, aunque la sobrecarga hemodinámica es un fuerte inductor del crecimiento cardíaco, no se descarta una implicación de factores humorales (Bugaisky y Zak, 1986).

En principio parece sorprendente que la expresión del genoma pueda estar modificado por factores mecánicos como el aumento de volumen telediastólico o la contracción parietal. Numerosos autores han preferido responsabilizar de ello a factores solubles como las catecolaminas (Simpson y cols., 1982) o la angiotensina II (Schunkert y cols., 1990). Probablemente existen diferencias importantes en lo que concierne a los primeros instantes de una sobrecarga mecánica (de presión o de volumen) u hormonal. En un primer momento, las señales que desencadenan el crecimiento se deben principalmente a la sobrecarga de presión, de postcarga. Respecto a la sobrecarga de volumen, se puede decir que su efecto activador de la transcripción y la síntesis proteica es más lenta en relación con la sobrecarga de presión (Swynghedauw y cols., 1990).

En una sobrecarga de presión, aumenta la precarga, es decir, la longitud inicial a la cual la sarcómera se empieza a acortar en la contracción, y también la tensión activa máxima (cuando el máximo de puntos de actina y miosina están en contacto). Por lo tanto, el sarcolema y sarcómeras resultan estiradas en la diástole, hasta que se alcanza la hipertrofia compensada y se normaliza, o casi, la presión telediastólica, multiplicando las sarcómeras y aumentando el volumen de los miocitos. La prolongación de la sobrecarga puede desbordar este mecanismo adaptativo y obligar de nuevo al corazón a utilizar su reserva diastólica. El estiramiento de la membrana y del sarcolema es, por tanto, la primera señal de crecimiento en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Swynghedauw y cols., 1990). La contracción se modifica desde el momento en que la sobrecarga tiene

lugar, la fibra se esfuerza en mantener una tensión activa normal, a expensas de disminuir la velocidad a la que esta tensión se desarrolla. Al principio, la velocidad media de acortamiento, por razones mecánicas, disminuye. La eficacia o economía del sistema, que se expresa en gramo de fuerza por molécula de ATP consumida, resulta óptima para una velocidad de acortamiento dada, pero la sobrecarga la disminuye. Los cambios de estructura del músculo cardíaco enlentecen la velocidad de acortamiento, permitiendo al músculo cardíaco contraerse con una eficacia aceptable. Por tanto, los parámetros ligados a la economía del sistema se encuentran en el origen de los cambios, sobretudo cualitativos, de expresión del genoma. La contracción cardíaca resulta modificada, principalmente al inicio de una sobrecarga de presión. En la sobrecarga de volumen la situación es diferente, puesto que es el estiramiento del músculo cardíaco en la diástole el inductor de la hipertrofia.

La hipertrofia debida a la hiperfunción de la glándula tiroidea está inducida por un aumento de volumen y de presión. El incremento en los niveles de tiroxina reduce la reserva vasodilatadora coronaria (Talifah y cols., 1983). Esto puede ser debido al incremento en el flujo en reposo inducido por el aumento en el metabolismo. El incremento en el ritmo cardíaco y la contractilidad que evoca la tiroxina, es debido fundamentalmente a un incremento en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Limas y Limas, 1987). Este incremento en las demandas del corazón, junto con el aumento del metabolismo (incremento en la síntesis de ARN y proteínas (Zierhut y Zimmer, 1989)) es lo que induce el desarrollo de una hipertrofia cardíaca. En contraste con la hipertrofia por sobrepresión, que induce hipertrofia del ventrículo afectado, el hipertiroidismo induce hipertrofia de ambos ventrículos.

La anemia crónica puede también inducir hipertrofia cardíaca (Scheel y Williams 1985). Esta hipertrofia está provocada por una sobrecarga de volumen, pero en este caso la capacidad transportadora del oxígeno por la sangre, y su viscosidad disminuyen, lo que la hace tener características distintas.

La creencia de que los factores humorales, producidos por un corazón al que se le exige un esfuerzo mayor de lo normal de una forma continuada, juegan un papel en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, se basa en el hecho de que en ciertas ocasiones, los dos ventrículos responden cuando es sólo uno el que está sobrecargado (Martin y cols., 1985). Esto se podría explicar diciendo que la presencia de determinadas sustancias producidas por el miocardio sometido a una sobrecarga, es capaz de promover la síntesis de proteínas. En este sentido, ciertos investigadores (Sen y Hollinger, 1983) observaron que el sobrenadante de un homogenado de tejido cardíaco de una rata espontáneamente hipertensa, era capaz de incrementar la síntesis proteica cuando se añadió a un cultivo de miocitos aislados de rata normotensa. Además, algunos investigadores (Sen y cols., 1976) han visto que en ratas espontáneamente hipertensas no siempre existe una relación directa entre la hipertensión y la hipertrofia. En este sentido, algunos fármacos disminuyen la presión sanguínea hasta valores normales como la hidralazina, pero no ejercen ningún efecto en la hipertrofia cardíaca, más aún, la administración de minoxidil incluso incrementa el grado de hipertrofia, a pesar de disminuir la presión (Sen y cols., 1977).

Para estudiar experimentalmente los distintos tipos de hipertrofia se han utilizado varios modelos experimentales en animales de laboratorio (Hamrell y cols., 1986). La hipertrofia inducida por hipertensión arterial en el hombre, puede estudiarse con distintos modelos que impongan al corazón del animal una sobrecarga de presión. Ésta se puede conseguir por obstrucción parcial de uno de los grandes vasos, hipertensión sistémica o pulmonar. La sobrepresión puede provocarse de forma aguda o gradual: por ejemplo, un clip no constrictor colocado en la aorta de un animal joven, se convertirá en constrictor lentamente a la vez que el animal vaya creciendo. También la infusión intravenosa de gel de sílice, monocrotalina o sefadex induce hipertrofia de forma gradual.

Las alteraciones que en el hombre desencadenan una hipertrofia por aumento del volumen que el corazón debe bombear pueden ser: fallo en la válvula mitral, comunicación entre la arteria aorta y la vena cava, bloqueo aurículo-ventricular, infarto de miocardio, etc. En los animales puede provocarse por una fístula arteriovenosa o un defecto en el septum



**Tabla 2:** Ejemplos de varios modelos experimentales utilizados para inducir hipertrofia cardíaca y autores que los han utilizado.

Sobrecarga de presión	Sobrecarga de volumen	Sobrecarga por múltiples factores
<p><i>Estenosis aórtica</i> Aorta ascendente (rata: Cutilletta y cols., 1975) Aorta abdominal (rata: Scamps y cols., 1990)</p> <p><i>Estenosis de la arteria pulmonar</i> (gato: Nuss y Houser, 1991)</p> <p><i>Hipertensión</i> Isquemia renal (rata: Aronson, 1980) Nefrectomía + DOCA + sal (rata: Bartsova y cols., 1969) Aldosterona + sal (rata: Garwitz y Jones, 1982) Rata espontáneamente hipertensa (Hayasi y Shibata, 1974) Rata Dahl espontáneamente sensible a sal (Pfeffer y cols., 1984)</p>	<p><i>Fístula arterio-venosa</i> (rata: Dart y Holloszy, 1969)</p> <p><i>Insuficiencia aórtica</i> (conejo: Hatt y cols., 1970)</p> <p><i>Anemia</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p>	<p><i>Hipertiroidismo</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Hipoxia</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Catecolaminas</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Ejercicio</i> carrera (rata: Hickson y cols., 1979) Natación (rata: Gülch, 1983)</p> <p><i>Desarrollo embrionario a baja temperatura</i> (pollo: Leighton y cols., 1964)</p> <p><i>Cardiomiopatía</i> (hámster: Rossner y Sachs, 1978)</p> <p><i>Infarto</i> (rata: Thollon y cols., 1989)</p>

Modificado de Bugaisky y Zak, 1986.

auriculoventricular. El infarto de miocardio puede imitarse mediante la ligadura de una arteria coronaria. Así se produce una pérdida de función en la parte de la pared ventricular afectada y el resto de tejido miocárdico no afectado desarrollará hipertrofia.

Otras formas de provocar el desarrollo de una hipertrofia cardíaca en un animal de experimentación para su posterior estudio puede ser la administración crónica de ciertas sustancias como la hormona tiroidea, hormona del crecimiento,  $\beta$ -agonistas, o adrenocorticoides. O bien someter los animales a estrés, aclimatarles al frío, provocarles una infección vírica o endocarditis bacteriana. Someter los animales a un ejercicio físico continuado, como correr o nadar, induce el crecimiento del corazón. En corazones viejos, el músculo cardíaco está hipertrofiado, presentando alteraciones en la funcionalidad mecánica similares a los encontrados la hipertrofia por sobrepresión (Hamrell y cols., 1986).

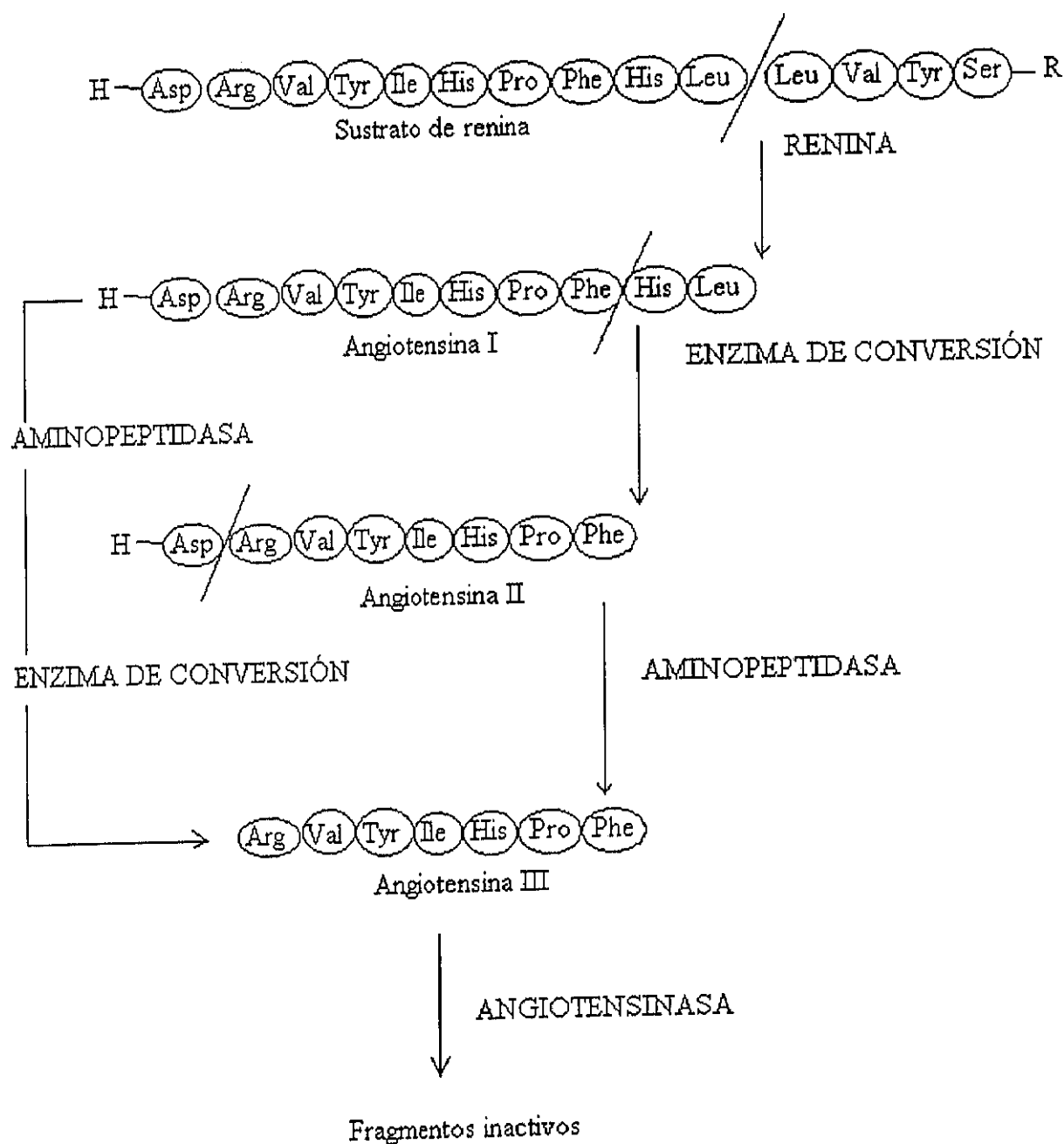
Los modelos de hipertrofia *in vivo*, tienen el problema del crecimiento del animal durante el progreso de la hipertrofia, que puede estar afectado por cirugía, tirotoxicosis, anemia, etc. Para salvar estas variaciones, y poder evaluar el grado de hipertrofia, el peso del corazón se debe relacionar con el peso corporal. Aquí aparece otro problema, los animales permanecen estabulados, pesan más y podría dar un falso índice de hipertrofia. Esto es fácilmente resuelto al comparar los ratios pesos cardíacos/pesos corporales de los animales a los que se ha inducido hipertrofia con otros controles que se mantengan en las mismas condiciones. Otro modo posible de salvar los problemas de los métodos *in vivo* es mediante la estimulación de hipertrofia en cultivo tisular, además, así se podrían estudiar los efectos de determinados agentes directamente a nivel celular (Bugaisky y Zak, 1986). Claro que las células mantenidas en cultivo no están en un medio fisiológico y los resultados hay que tomarlos con precaución.

### 2.1.1.- IMPLICACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

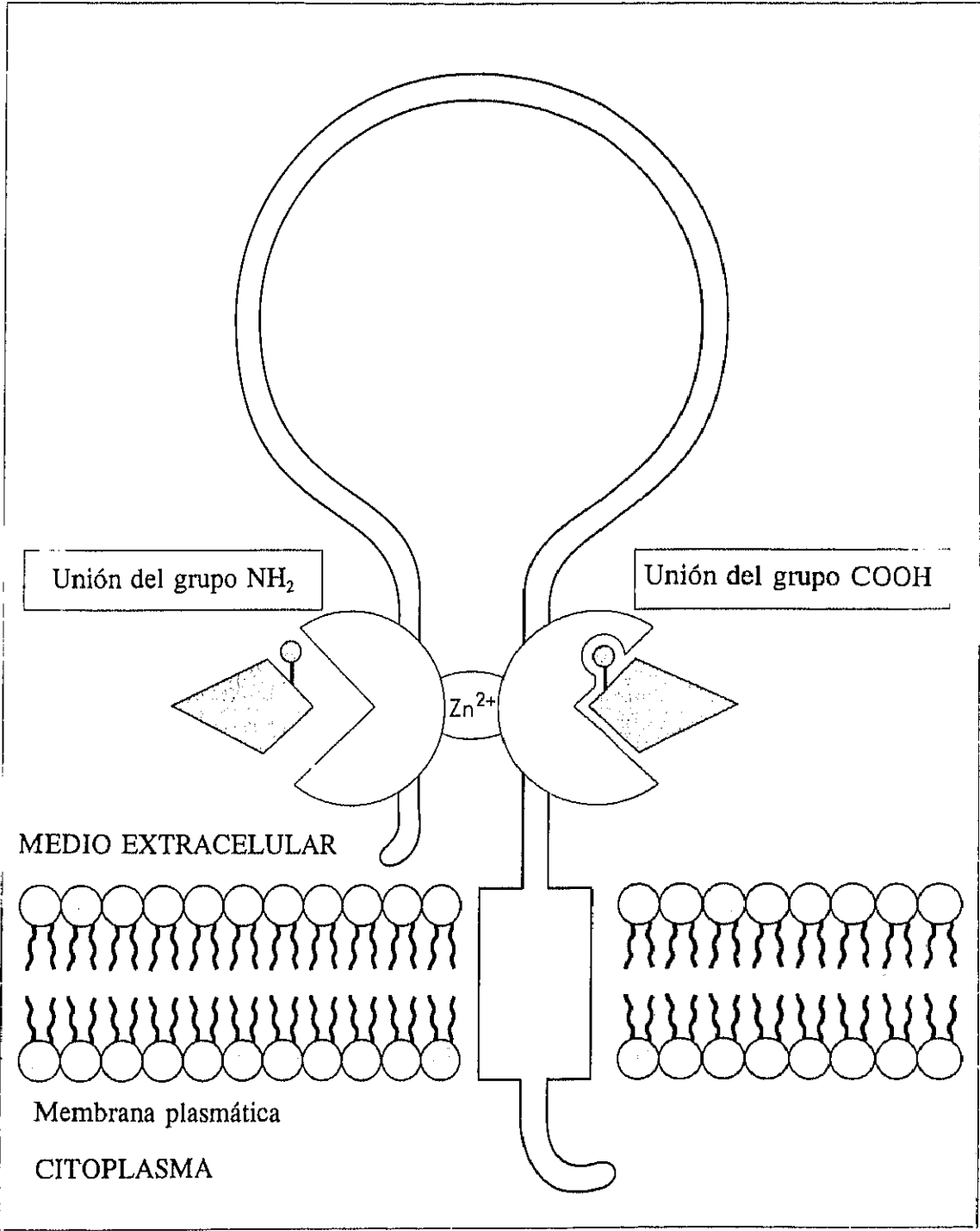
El sistema renina-angiotensina (SRA) juega un papel importante en la regulación cardiovascular y en el mantenimiento de la homeostasis hidrosalina. En este sistema (fig. 1), la renina secretada por el riñón a la circulación, actúa sobre un sustrato, el

angiotensinógeno, que ha sido segregado desde el hígado, para producir angiotensina I (AT I). Este decapeptido es convertido por el enzima de conversión de angiotensina (ECA), una dipeptidil peptidasa (fig. 2), a angiotensina II (AT II), que es la sustancia activa. La contribución de este SRA circulante a la homeostasis cardiovascular ha sido conocida desde hace tiempo (Haber, 1976). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que un SRA endógeno está presente en muchos tejidos locales, incluido el corazón y los vasos sanguíneos (Lindpaintner y cols., 1988 y 1991; Dzau, 1988), y estos sistemas ejercen influencia paracrina o autocrina en diversas funciones tisulares. Para probar la existencia de un SRA tisular independiente del circulante, se debe demostrar la síntesis local de sus componentes: angiotensinógeno, renina, y enzima de conversión de angiotensina (ECA) que son necesarios para la generación del péptido biológicamente activo, la AT II. Además, para decir que el péptido es localmente activo, se deben encontrar receptores apropiados y sistemas de transducción de las señales. La demostración de que la actividad de este sistema, o sus elementos individuales están modulados por ciertos estímulos confirmará su relevancia, sobretodo si los mecanismos reguladores demuestran que actúan independientemente del SRA circulante.

Respecto a la primera parte de este sistema, se ha demostrado que el gen de angiotensinógeno se expresa en el tejido cardíaco (Kunapuli y Kumar, 1987), y además se ha probado que el corazón aislado es capaz de liberar angiotensinógeno (Lindpaintner y cols., 1990). Una vez que tenemos el angiotensinógeno, es necesario la acción de la renina sobre él, para la producción de AT I. También se ha encontrado en el corazón la expresión del gen de la renina (Dzau y Re, 1987), aunque se ha sugerido que la mayor parte de la renina encontrada en el corazón resulta de la captación de este enzima desde el plasma al tejido cardíaco (Danser y cols., 1994). Ahora el siguiente paso en la cascada enzimática, viene dado por el ECA, que promueve el paso de AT I a AT II. Para examinar si la producción de AT II ocurre en el corazón en funcionamiento, en un trabajo realizado por Linz y cols. (1986) se midió la AT II en el efluente de corazones aislados, los cuales fueron perfundidos con AT I. Sus resultados demostraron que la AT I fue rápidamente convertida a AT II, lo que prueba la existencia de ECA cardíaca funcionalmente activa. Ahora que tenemos la sustancia biológicamente activa, AT II, producida a nivel cardíaco, la presencia de receptores funcionales de AT II representa un requisito para la definición



**Fig. 1:** Esquema representativo del sistema renina-angiotensina. Modificado de Johnston, 1990.



**Fig. 2:** Esquema representativo del ECA, mostrando los dos posibles sitios activos de unión al substrato. Modificado de Johnston, 1993.

de un SRA cardíaco funcional. Las distintas acciones de la AT II en distintos tejidos sugieren que la generación local de este péptido puede servir como un control regional, y que probablemente existe una heterogeneidad en los receptores de AT II. También se ha sugerido la existencia de distintos subtipos de receptores de AT II, por diferencias encontradas en la susceptibilidad de varios análogos de AT II. Hasta no hace mucho tiempo, la definición de distintos subtipos de receptores de AT II no fue posible por la falta de antagonistas apropiados de AT II que detectaran la heterogeneidad en los receptores desde un punto de vista farmacológico. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antagonistas peptídicos y no peptídicos de la AT II ha permitido la caracterización de dos tipos de receptores, que se unen a la AT II con la misma afinidad pero muestran diferente afinidad de unión con determinados análogos de la AT II. Los dos tipos de receptores, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, tienen distinta distribución en distintos órganos y en distintas especies. Un trabajo realizado en trabécula auricular humana obtenida en cirugía (Chen y cols., 1991), demostró que la AT II producía un efecto inotrópico positivo que era inhibido fuertemente por saralasina (la saralasina es un bloqueante peptídico no específico de los receptores de AT II), lo cual demostró la existencia de receptores de AT II funcionalmente activos en las aurículas de corazón humano. Sin embargo, este trabajo no diferenció entre los dos tipos de receptores, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, para lo cual habría sido necesario el uso de bloqueantes específicos de cada tipo. El receptor AT<sub>1</sub> es sensible al losartán (un bloqueante no peptídico) (Smith y cols, 1992), que tiene efectos inhibitorios de la vasoconstricción e hipertensión en modelos animales. Este receptor media la mayoría de las acciones bioquímicas y fisiológicas conocidas de la AT II. El receptor AT<sub>2</sub> es insensible al losartán pero se inhibe por [pNH<sub>2</sub>-Phe<sup>8</sup>]AT II, entre otros. Este receptor está presente en animales jóvenes en varios sitios que no contienen receptores de AT II en el adulto (Millan y cols., 1991), lo que sugiere que este receptor pudiera estar implicado en las acciones de la AT II en el desarrollo. Además de estos dos tipos de receptores de AT II, es posible que existan diferentes subtipos. En el corazón de rata se han encontrado receptores AT<sub>1</sub> en los nodos senoauricular y auriculoventricular (Saavedra y cols., 1993). Otros estudios realizados para investigar la existencia de receptores de AT II, diferenciando entre AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, en el corazón de rata (Sechi y cols., 1992) han demostrado que ambos receptores están presentes en el corazón de este animal con densidad similar, en las aurículas, ambos

ventrículos y septum interventricular, siendo significativamente mayor en el nodo auriculoventricular. El uso de losartán (bloqueante de  $AT_1$ ) y PD1223177 (bloqueante del receptor  $AT_2$ ), sugirió la presencia de ambas clases de receptores en el corazón, contribuyendo cada una aproximadamente al 50 % del total de receptores. Además, los resultados de este estudio indicaron que los dos tipos de receptores se diferencian en sus señales de transducción, estando mediada la respuesta a los receptores  $AT_1$  por proteínas G y no así en los  $AT_2$ . Más aún, estos trabajos encontraron que la densidad de receptores de AT II incrementó justo después del nacimiento, para disminuir luego hacia valores prenatales, resultados similares fueron obtenidos por Urata y cols. (1989), quienes encontraron un descenso en los sitios de unión de AT II en ventrículos de rata, después del nacimiento. En este sentido, Feolde y cols. (1993) encontraron que en el corazón de rata neonata existe un predominio de los receptores  $AT_2$ . Estos hechos hacen pensar que exista en el corazón una regulación de los receptores de AT II por el crecimiento.

#### 2.1.1.1.- *Efectos cardiovasculares de la AT II*

La AT II puede alterar la función cardíaca debido a una modificación del tono vascular coronario, por un efecto directo en los receptores, y por promover hipertrofia cardíaca. Desde el punto de vista del tono coronario, la AT II es un potente vasoconstrictor (Johnston, 1990). Este efecto puede ser directo, a través de los receptores de AT II o indirecto, incluyendo la modulación del tono adrenérgico o interacción con otros sistemas neurohormonales (Dzau y Pratt, 1993). La unión de este péptido con su receptor activa la fosfolipasa C, con la consiguiente hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato a diacil glicerol e inositol trifosfato. La actividad de la proteína quinasa C sensible al calcio está modificada por estos mensajeros intracelulares, que pueden incrementar la concentración citoplasmática de calcio e inducir la contracción del músculo liso vascular. La vasoconstricción también puede ser mediada por facilitación de la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas, ampliando de esta forma la vasoconstricción simpática (Saxena, 1992).

En el músculo cardíaco, la AT II incrementa la contractilidad, pudiendo estar este efecto inotrópico mediado por ambos mecanismos, directo e indirecto (Lindpaintner y cols., 1988). En este sentido, estudios en tejido cardíaco humano (Chen y cols., 1991) han demostrado que la AT II aumenta la fuerza de contracción y el ritmo, siendo este efecto inotrópico y cronotrópico bloqueado por la saralasina.

También se ha implicado al SRA en el desarrollo de hipertrofia. A pesar de que se están realizando muchos estudios sobre la hipertrofia cardíaca, los mecanismos que contribuyen al crecimiento del cardiomiocito permanecen en controversia. Aunque se ha identificado a la sobrecarga mecánica y al estiramiento del músculo cardíaco como un estímulo importante en el desarrollo de hipertrofia inducida por hipertensión, la acción de determinadas hormonas no queda descartada. Se ha demostrado, por ejemplo, que la AT II es un potente estímulo directo para la síntesis de proteínas y crecimiento celular en miocitos cardíacos en cultivo (Aceto y Baker, 1990). En un modelo de crecimiento rápido cardíaco, como son los cerdos neonatos, se ha demostrado que la inhibición del SRA, tanto con un inhibidor del ECA, como por un bloqueante de los receptores de AT II, condujo a un menor crecimiento cardíaco y a un menor contenido en ARN y proteínas en el corazón, lo que sugiere la implicación del SRA en el crecimiento (Beinlich y cols., 1991). En ratas espontáneamente hipertensas el desarrollo de hipertensión se acompaña de hipertrofia cardíaca (Sen y cols., 1976). Curiosamente, la normalización de la presión arterial, una vez elevada, no siempre revierte o inhibe esta hipertrofia, sugiriendo que los factores hemodinámicos no son los únicos responsables de la hipertrofia (Linz y cols., 1989a). Sin embargo, el tratamiento con inhibidores del enzima de conversión (IECA), bloqueó o revirtió la hipertrofia (Pfeffer y cols., 1982; Linz y cols., 1989a). Conclusiones similares se pueden sacar de experimentos donde la hipertrofia fue inducida por constricción aórtica (Baker y cols., 1990). Más aún, infusiones de dosis no presoras de AT II provocaron la aparición de hipertrofia (Khalirallah y Kanabus, 1983), así pues, los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* sugieren que la AT II juega un papel importante en la hipertrofia cardíaca (Re y Rovigatti, 1988; Schelling y cols., 1991).



Lo anteriormente expuesto sugiere la implicación del SRA en la hipertrofia cardíaca, pero no distingue claramente entre el sistémico o el tisular. El SRA cardíaco puede ser activado en ciertas condiciones, y parece ser importante en el control de los cambios hemodinámicos y estructurales que ocurren en ciertas condiciones fisiopatológicas. En este sentido, ciertos estudios realizados en ratas en las que se indujo hipertrofia cardíaca por constricción de la aorta abdominal (Baker y cols, 1990), demostraron la prevención de la hipertrofia ventricular izquierda con dosis de un inhibidor del ECA que no afectaron la presión arterial, descartando así un efecto hemodinámico de este fármaco. Además, estos investigadores midieron el ARN mensajero del angiotensinógeno en el corazón y observaron que estaba aumentado en el ventrículo izquierdo de los corazones hipertróficos, sugiriendo que el SRA tisular estaba implicado en la génesis de la hipertrofia. Además, midieron la actividad de la renina plasmática, como índice de la actividad del SRA circulante, y encontraron que aunque aumentó al día siguiente a la imposición del clip en la aorta abdominal, volvió a valores normales a los tres días después de la operación. Estos datos sugieren que es el SRA cardíaco y no el circulante, el implicado en perpetuar el crecimiento celular, al menos en este modelo de hipertrofia. Otros estudios realizados en insuficiencia cardíaca por ligadura de la arteria coronaria en la rata (Hirsch y cols., 1991) han apoyado esta teoría, ellos estudiaron la actividad del ECA en el plasma y en el tejido cardíaco de estos animales y encontraron que la circulante no era distinta entre los animales controles y los que tenían insuficiencia cardíaca, pero la actividad del ECA tisular estaba incrementada en los animales a los que se les había ligado la coronaria, estando este aumento en proporción al tamaño del infarto. Así pues, la actividad del SRA parece estar incrementada en modelos experimentales de hipertrofia cardíaca. En un modelo de hipertrofia cardíaca compensada, inducida por estenosis en la aorta (Schunkert y cols., 1990), los corazones hipertróficos se caracterizaron por un incremento de un 30% en el peso del ventrículo izquierdo, y la actividad del ECA cardíaco fue significativamente mayor en el tejido obtenido de varias regiones de este ventrículo, mientras que no hubo diferencias en la actividad del enzima del ventrículo derecho, no hipertrófico, del mismo animal y de los animales controles. Este hallazgo sugiere que el aumento en la actividad del ECA no está relacionado con una alteración en el SRA sistémico, sino que más bien está relacionado con el lugar de aumento de la tensión.

Además, los análisis del ARN mensajero del ECA mostraron que aunque se encontró en el ventrículo izquierdo de ratas controles, en las hipertróficas estaba multiplicado por cuatro. En este trabajo, se estudiaron las consecuencias del aumento en la conversión de AT I a AT II en la hipertrofia, utilizando corazones aislados perfundidos y latiendo. La perfusión con AT I produjo más AT II en los corazones hipertróficos como era de esperar de su aumentada actividad de la ECA. La activación cardíaca de la AT II causó efectos similares en el incremento de la resistencia coronaria vascular y en la contracción sistólica en el grupo control y en el hipertrófico. Sin embargo, en el grupo control, la generación intracardíaca de la AT II tuvo mínimos efectos en la función diastólica. Por el contrario, los corazones hipertróficos demostraron una depresión en la relajación diastólica y en la distensibilidad del ventrículo en la diástole en respuesta a la perfusión con AT I. Esto indica que la mayor generación de AT II en los corazones hipertróficos contribuyen a una disfunción en la relajación. Cuando los corazones hipertróficos fueron perfundidos con un inhibidor del ECA a la vez que AT I, no se observó este efecto en la función diastólica.

Recientemente se ha visto en preparaciones cardíacas humanas que otro enzima, diferente del ECA, es capaz de promover la conversión de AT I en AT II (Urata y cols., 1990). Este enzima no es bloqueado por los inhibidores del ECA y puede potencialmente mediar la formación de AT II en el modelo de hipertrofia. Por este motivo, se ha estudiado la posible contribución de este enzima distinto del ECA en la formación de AT II en los corazones hipertróficos (Schunkert y cols., 1991). En un modelo de estenosis de la aorta en rata, se vio que el ECA estaba incrementado en el miocardio hipertrófico. Además, se evaluó la contribución de este enzima a la formación de AT II en el tejido miocárdico hipertrófico, perfundiendo los corazones aislados a la vez con AT I y un inhibidor de la ECA. Los resultados indicaron que el 70 % de la producción de AT II fue bloqueada por el inhibidor del ECA utilizado, sugiriendo que éste es el paso predominante para la formación de AT II en los corazones hipertróficos. Además, de esta manera (perfundiendo el corazón con AT I y un inhibidor del ECA simultáneamente) se previno el incremento en la resistencia vascular coronaria y la depresión de la función diastólica.

Se sabe que una característica de los corazones hipertróficos es su menor capacidad para mantener una función diastólica normal en respuesta a una situación de isquemia (Lorell y cols., 1986). Recientemente se ha comprobado que la AT II aumenta la disfunción diastólica en corazones aislados de conejo (Mochizuki y cols., 1992). En este trabajo se observó que los corazones perfundidos con AT II demostraron una depresión progresiva del flujo coronario, lo que sugiere el aumento en la AT II disponible por el corazón puede modificar el tono coronario y disminuir el flujo coronario en situación de isquemia. Además, este estudio demostró que los corazones tratados con AT II se relajaban peor, y este efecto no se revertía de forma adecuada en reperfusión. Esto indica que la AT II ejerce un efecto directo adverso en la función diastólica durante isquemia-reperfusión.

## **2.2.- CARACTERÍSTICAS DEL CORAZÓN HIPERTRÓFICO**

En general, el crecimiento de un órgano puede ser el resultado o bien de división celular (hiperplasia), o bien del aumento en el tamaño de las células que lo componen (hipertrofia). En el mamífero adulto, no ocurre división celular en los miocitos cardíacos (Zak, 1974), y el crecimiento del corazón se relaciona con hipertrofia del cardiomiocito y no con hiperplasia. Las características del crecimiento cardíaco varían dependiendo del estímulo: severidad, duración y tipo de sobrecarga (de presión o de volumen), la forma de aplicación (aguda o gradual) y la edad y especie del animal. La adaptación a la sobrepresión induce una hipertrofia de tipo concéntrico, es decir, el corazón se adapta aumentando tanto la pared libre del ventrículo implicado, como el septum interventricular, a expensas de reducir el volumen de la cavidad ventricular. En el caso de una hipertrofia provocada por una sobrecarga de volumen, la hipertrofia es de tipo excéntrico (Lin y cols., 1977), aumentando la cavidad ventricular. El incremento en la masa cardíaca inducido por hormona tiroidea es más moderado que en la debida a sobrepresión por una constricción aórtica, debido a la menor sobrecarga de presión producida por la tironina (Campbell y cols., 1991). En este caso se hipertrofian los dos ventrículos, aunque el derecho lo hace en mayor medida debido a que este estímulo produce mayor sobrepresión en este lado del corazón (Lortet y cols., 1989).

Aunque la hipertrofia cardíaca, que ocurre como respuesta a una sobrecarga hemodinámica, se considera generalmente como un proceso compensatorio que normaliza la tensión de las paredes cardíacas, compensando la actividad cardíaca con las demandas, se ha asociado con muchas anormalidades. Por ejemplo, ya en 1969 Spann encontró que el músculo cardíaco hipertrófico se caracterizaba por una contracción inadecuada y en 1985 Tarazi observó que el contenido de colágeno del ventrículo izquierdo se encontraba elevado debido a fibrosis difusa. Además, la densidad de mitocondrias por volumen celular resulta disminuida (Page y McCallister, 1973; Kayar y Weiss, 1992). El miocardio hipertrófico también se caracteriza por tener alteradas las características electrofisiológicas (Aronson, 1980) y una función diastólica inadecuada (Fouad y cols., 1984). Así pues, aunque la hipertrofia cardíaca sea, en principio, un proceso compensatorio, existen algunas consecuencias patológicas asociadas con este proceso, además de ser por sí misma un indicador de varias patologías cardíacas futuras (Weber, 1988).

### 2.2.1.- VASCULATURA CORONARIA

Una de las manifestaciones patológicas de la hipertrofia cardíaca es la anormalidad en el sistema coronario vascular. Cuando la masa cardíaca aumenta, el área relativa transversal de los vasos coronarios es distinta de la situación de normalidad. Esta variación está en función de varios factores entre los que se encuentra el estímulo que provoca la hipertrofia. En general, los corazones hipertróficos están peor irrigados. Como excepción indicaremos que en la hipertrofia causada por hipertiroidismo, el área transversal de la vasculatura coronaria incrementa en proporción al incremento de la masa, y en la provocada por anemia, el crecimiento de los capilares coronarios excede al incremento del miocardio (Chilian y Marcus, 1987). En pacientes con hipertrofia cardíaca debido a una sobrecarga de volumen se ha encontrado una disminución en la reserva coronaria (Doty y cols., 1984).

En la hipertrofia provocada por hipertensión, se ha descrito un descenso en la densidad de las arteriolas (Breisch y cols., 1985), lo cual representa una reducción en el número de vasos por unidad de masa del miocardio. Desde el punto de vista fisiológico,

aunque la perfusión del miocardio con hipertrofia compensada en reposo es normal, otros parámetros funcionales de la circulación coronaria están alterados en comparación con los de corazones normotensos no hipertróficos. En este sentido hay que indicar el descenso en la reserva coronaria (Rembert y cols., 1878; Wangler y cols., 1982; Peters y cols., 1984) y el incremento en la resistencia coronaria mínima por unidad de masa (Alyono y cols., 1986). Puesto que la resistencia coronaria está elevada y la reserva vasodilatadora está disminuida, la respuesta vasodilatadora en los ventrículos hipertróficos resulta insuficiente. Ésto es más acusado en el subendocardio. Algunos investigadores (Rembert y cols., 1978) han indicado que la hipertrofia ventricular izquierda altera la normal distribución de perfusión subendocardio-subepicardio en reposo, y debido a ello, la reserva vasodilatadora del subendocardio y midmiocardio resulta comprometida en ciertas ocasiones (Bache y cols, 1981). En suma, el corazón hipertrófico por sobrepresión muestra alteraciones estructurales de la vasculatura coronaria que pueden contribuir a los déficits en la perfusión en períodos de estrés cardíaco. De este modo, aunque las arterias del epicardio incrementan ligeramente el área transversal, no lo hacen en proporción al aumento de la masa cardíaca. Durante el período de hipertrofia, aunque se ha visto que existe una cierta proliferación de los capilares, no es suficiente para prevenir el aumento de distancias intercapilares por el aumento del tamaño de las fibras musculares (Kayar y Weiss, 1992). Puesto que la sobrepresión a que están sometidas las capas más profundas del miocardio es mayor, la alteración en las propiedades de los capilares es más profunda en el subendocardio (Bache, 1988).

### 2.2.2.- ALTERACIONES CELULARES

El incremento crónico en el trabajo impuesto al corazón, modifica profundamente tanto el tamaño como la estructura de los miocitos cardíacos. Puesto que los cardiomiocitos adultos son células diferenciadas y han perdido su capacidad de multiplicación, en respuesta a una sobrecarga hemodinámica aumentan su tamaño sin dividirse y, simultáneamente, el tipo y/o contenido de las proteínas claves para el cambio en la contracción y relajación cardíacas (Schwartz y cols., 1992). La alteración más evidente de la hipertrofia cardíaca en los miocitos cardíacos es su aumento de tamaño. Sin embargo,

no todas las células ventriculares aumentan su volumen en igual medida. Campbell y cols. encontraron que los miocitos que sufren un mayor incremento en su tamaño son los que en condiciones normales son más pequeños. Parece ser que en condiciones normales, en el ventrículo izquierdo de rata, las células epicárdicas son más pequeñas que las endocárdicas, y son estas primeras las que experimentan mayor aumento en su tamaño en respuesta a una sobrecarga (Campbell y cols., 1991). Estos investigadores lo explican sugiriendo que existe un límite máximo al tamaño de los miocitos.

Como hemos indicado, el incremento en la demanda de trabajo del corazón, tiene dos consecuencias que implican el crecimiento del tejido miocárdico: aumento en la masa cardíaca debido a hipertrofia de los miocitos y a hiperplasia de las células no musculares, y cambios en la composición. Cuando el corazón se encuentra sometido a un sobreesfuerzo, la tensión de las paredes ventriculares estimula la síntesis de proteínas (Morgan y cols., 1987). De hecho, en corazones hipertróficos el contenido de ARN mensajero está incrementado (Swynghedauw y cols., 1984).

Las propiedades centrales del miocardio hipertrófico son: un incremento en el contenido en proteínas contráctiles, inducción de distintas isoformas de estas proteínas contráctiles y la expresión de marcadores embrionicos, lo cual depende de la activación de la transcripción de los correspondientes genes (Chien y cols., 1991; Cutilletta, 1984). Los cambios observados en la composición de los miocitos hipertróficos incluyen la cantidad relativa y las propiedades de las proteínas intracelulares. Por ello, la sobrecarga de trabajo no sólo afecta a la transcripción genética de forma global, sino que regula la expresión de determinados genes de forma selectiva (Bugaisky y Zak, 1986). Esta respuesta miocárdica induce cambios cualitativos en la composición de las proteínas contráctiles, incluyendo la inducción de genes que codifican para proteínas que normalmente sólo están expresadas en el desarrollo embrionario (Schwartz y cols., 1986). Los primeros y más estudiados genes son los que codifican las dos principales proteínas contráctiles, la miosina y la actina. En ratas, los dos isogenes que normalmente se expresan en el período fetal (cadena pesada de la  $\alpha$  y  $\beta$ -miosina y la  $\alpha$ -actina) son reexpresadas en el ventrículo hipertrófico (Cutilletta, 1984; Schwartz y cols., 1986; Izumo

y cols., 1987) aunque los mecanismos que regulan la expresión de los genes de estos dos constituyentes de la célula cardíaca tienen distinta respuesta a la sobrecarga (Chassagne y cols., 1993). Pero no sólo está aumentada la síntesis de proteínas contráctiles, junto con el aumento de ADN y ARN, los corazones hipertróficos tienen un mayor contenido en hidroxiprolina (aminoácido presente casi exclusivamente en el colágeno) y este aumento en el contenido de colágeno por parte de los corazones hipertróficos no se revierte cuando desaparece la causa que indujo la hipertrofia (Cutilletta y cols., 1975). Aquí debemos indicar que en la hipertrofia provocada por la hormona tiroidea, el colágeno no está aumentado, en contraste con la inducida por una aumento en la presión.

Además, en los corazones hipertróficos las mitocondrias, que producen ATP, no aumentan lo necesario en relación a las miofibrillas, que lo consumen (Kayar y Weiss, 1992). En animales con constricción aórtica se ha observado que el volumen de la fracción de miofibrillas aumenta en mayor medida que la fracción de mitocondrias (Anversa y cols., 1980). Más aún, los corazones hipertróficos tienen menor contenido en carnitina, (esencial en el transporte de los ácidos grasos desde el citosol a la mitocondria), estando esta disminución en relación directa con el grado de hipertrofia (Yang y cols., 1992).

### 2.2.3.- CONTRACTILIDAD

En la hipertrofia cardíaca no sólo tiene lugar el crecimiento de los cardiomiocitos, sino que también las células endoteliales, células del músculo liso vascular, fibroblastos y macrófagos pueden contribuir al desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda. Lo cual podría contribuir a las anomalías en la contracción observadas en los corazones hipertróficos. En un estudio realizado en pacientes hipertensos, se analizó el estado inotrópico de sus corazones y se observó que la contractilidad era menor según la masa iba aumentando (Grossman y Messerli, 1992). En la hipertrofia compensada, la contracción es suficiente para cubrir las demandas del organismo, pero frecuentemente la función diastólica está disminuida (Fagard, 1992). Cuando aparecen alteraciones en la contracción, aunque se pudiera pensar que el incremento en tejido conectivo sea el responsable de ello, es cierto que los miocitos procedentes de estos ventrículos

hipertróficos tienen alterada su contractilidad. Estas células se contraen en menor extensión y con una velocidad más lenta. No sólo la contracción resulta enlentecida, sino también la relajación, y estas alteraciones no dependen de la morfología de la célula, puesto que persisten después de corregir por longitud, anchura, superficie y longitud inicial de las sarcómeras, lo que indica que las alteraciones encontradas en la contracción de los corazones hipertróficos son intrínsecas al cardiomiocito hipertrófico (Mann y cols., 1991; Hamrell y cols., 1992).

Para intentar explicar los motivos de esta alteración en la contracción, Mann y cols. (1991), estudiaron la contracción de células hipertróficas y normales, en distintas concentraciones de calcio y en contracción tetánica, observando que a todas las concentraciones estudiadas, la contracción de las células hipertróficas fue menor y, más aún, las diferencias entre células normales e hipertróficas se hicieron más acusadas según la concentración de calcio a que se expusieron las células era mayor, (lo cual estuvo de acuerdo con resultados anteriores (Lortet y cols., 1989) que demostraron una menor respuesta inotrópica al calcio en los corazones hipertróficos). El acortamiento máximo que encontraron en contracción tetánica en las células hipertróficas fue menor que en las controles. Basándose en estos resultados, sugirieron que la contracción no estaba deprimida como consecuencia de menor disponibilidad de calcio intracelular o como una menor sensibilidad de los miofilamentos al calcio. Últimamente se ha sugerido que las alteraciones en la contracción podrían ser debidas a alteraciones en el retículo sarcoplásmico. Lo que se ha propuesto es que la recaptación del calcio está disminuida en los miocitos hipertróficos, lo que hace, por una parte que el calcio permanezca elevado más tiempo y enlentezca la relajación, y por otra que haya menor calcio disponible para liberarse desde el retículo sarcoplásmico y disminuya la contracción (Schouten y cols., 1990; Bailey y Houser, 1993).

Como resultado del incremento de tamaño del miocito cardíaco en la hipertrofia, la membrana celular debe aumentar su superficie en paralelo con el grado de hipertrofia. Sin embargo, el crecimiento de la membrana no es un proceso homogéneo, siendo la parte externa la que menos incrementa su superficie y la correspondiente a los túbulos T la que



más. Por lo tanto, es posible que en los miocitos hipertróficos exista una nueva distribución de las proteínas de membrana. Algunas de estas proteínas han sido estudiadas por Mansier y cols. (1990). Estos investigadores estudiaron los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, muscarínicos y ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  encontrando una menor densidad de receptores  $\beta$ , lo que podría ser explicado por una regulación a la baja en respuesta a una elevación en los niveles de catecolaminas, sin embargo, cuando se midieron el número de estos receptores por miocito, se observó que no existía ninguna variación. Lo mismo ocurrió para los receptores muscarínicos. La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  está constituida por dos monómeros,  $\alpha$  y  $\beta$ , el primero tiene dos isoformas:  $\alpha_1$ , que tiene baja afinidad por la ouabaina y es responsable de los efectos tóxicos de esta droga, y  $\alpha_2$ , que tiene alta afinidad por ella y es responsable de los efectos farmacológicos. Cuando se estudió los sitios de baja afinidad se observó lo mismo que para los receptores  $\beta$  y muscarínicos, pero los de alta afinidad a la ouabaina resultaron incrementados incluso en densidad. Estos resultados indican que el crecimiento de la membrana no es un proceso homogéneo, pudiendo incrementarse la síntesis de ciertas proteínas de su membrana, y no de otras.

#### 2.2.4.- ALTERACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS

Antes de comenzar a tratar de discutir sobre las posibles alteraciones electrofisiológicas del corazón hipertrófico, puede ser útil recordar algunos conceptos básicos de la electrofisiología cardíaca en situación de normalidad.

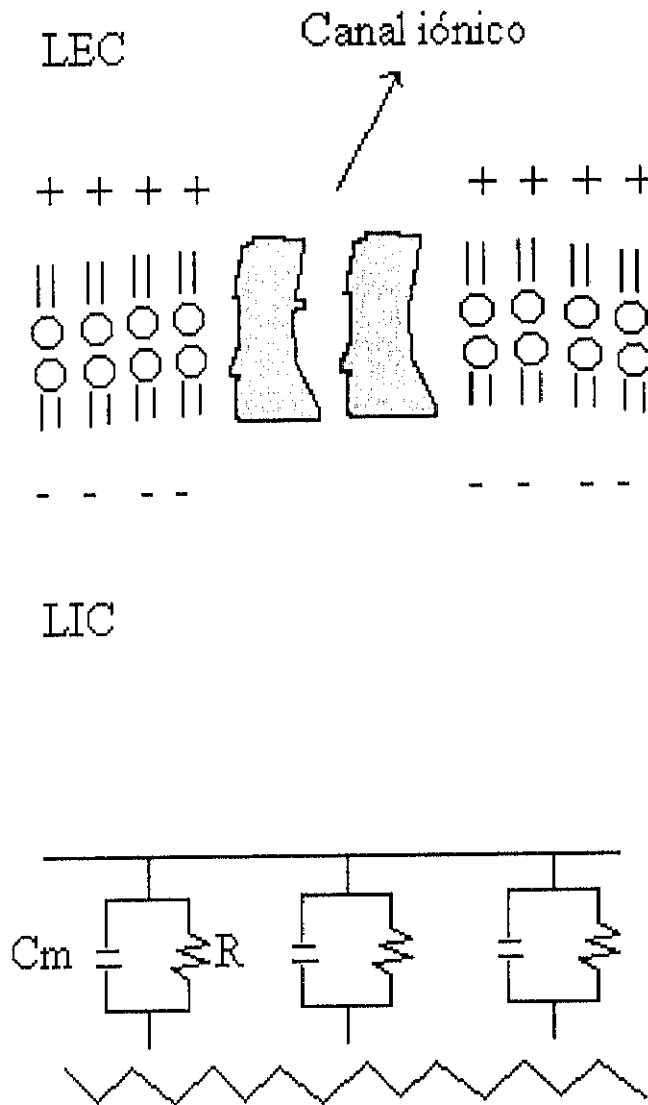
##### 2.2.4.1.- *Conceptos básicos de electrofisiología cardíaca.*

Los conceptos básicos de electricidad son tres: carga, carga en movimiento y la fuerza que causa ese movimiento. En biología, la carga está contenida en los iones disueltos en los líquidos intra y extracelulares, el movimiento de estos iones al entrar o salir de la célula, se puede medir como una corriente eléctrica (carga en movimiento), y la fuerza que causa el movimiento de los iones, o que aparece por su movimiento, es la diferencia de potencial o voltaje. El estudio de los fenómenos eléctricos en biología, ha contribuido de manera importante al conocimiento de la fisiología normal y patológica.

Todas la células tienen en su superficie una barrera al movimiento iónico llamada membrana celular. Esta membrana es una estructura clave en el funcionamiento del miocito cardíaco. Por ser semipermeable, mantiene la composición del líquido intracelular, creando una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula (negativa en el interior y positiva en el exterior). Además, las células cardíacas son excitables, es decir, tienen la capacidad de responder ante un estímulo con potenciales de acción, gracias a la presencia en la membrana de distintos canales iónicos, que se abren o cierran en respuesta al potencial de membrana o a la presencia de ciertas sustancias químicas.

La membrana celular separa el líquido intracelular del extracelular, líquidos que llevan disueltos distintos iones. Básicamente está formada por fosfolípidos y proteínas. El componente de la membrana celular, que representa la mayor barrera para la libre difusión de las sustancias de los líquidos intra y extracelulares, es la bicapa molecular de fosfolípidos. La mayoría de estas moléculas tienen una terminación lipófila y otra hidrófila, y en condiciones normales se alinean dejando sus terminaciones lipófilas juntas y las hidrófilas hacia afuera, en contacto con las soluciones electrolíticas del interior y exterior de la célula. Puesto que los líquidos intra y extracelulares llevan disueltos iones (carga eléctrica), estos líquidos son conductores de corriente eléctrica (una carga en movimiento produce una corriente eléctrica) y puesto que la bicapa lipídica impide el paso de los iones (es un aislante), desde el punto de vista eléctrico, se puede considerar a la membrana como un condensador. Sin embargo, en la membrana celular también hay proteínas que crean un ambiente adecuado para el paso de agua e iones a través de ella, con una resistencia finita al paso de corriente eléctrica. La combinación de las propiedades de resistencia y capacitancia nos permite utilizar la analogía de un condensador y una resistencia en paralelo para hablar del comportamiento eléctrico de una pequeña porción ("parche") de membrana (fig. 3).

La conductancia de la membrana es su capacidad para permitir el paso de iones a su través como consecuencia de un campo eléctrico. La conductancia está en relación con dos elementos importantes: la permeabilidad de la membrana al ión en cuestión y su concentración a ambos lados de la membrana. Por ejemplo, si la membrana tiene poros



**Fig. 3:** Esquema de una membrana y su analogía eléctrica. LEC, líquido extracelular; LIC, líquido intracelular;  $C_m$ , capacitancia;  $R$ , resistencia. Modificado de Fozzard y Arnsdorf, 1986.

que permiten fácilmente el paso al sodio (permeabilidad alta) pero en las soluciones este ión está ausente, la conductancia será nula. En este sentido cada ión tiene un potencial de equilibrio que viene determinado por la ecuación de Nerst:

$$V_K = RT/F \ln [K^+]_o/[K^+]_i$$

donde  $V_K$ , es el potencial de equilibrio, en este caso para el potasio;  $R$ , la constante de los gases;  $T$ , la temperatura absoluta; y  $F$ , la constante de Faraday;  $[K^+]_o$  es la concentración, en este caso del potasio, en el líquido extracelular; y  $[K^+]_i$  en el líquido intracelular. Conociendo la magnitud de una determinada corriente iónica a un determinado voltaje de membrana, y conociendo el potencial de equilibrio para dicho ión, podemos calcular la conductancia, a partir la siguiente fórmula:

$$I_K = g_K (V - V_K)$$

donde  $I_K$  es la magnitud de la corriente iónica (en este caso de potasio) medida al potencial  $V$ ,  $V_K$  es el potencial de equilibrio para este ión, y  $g_K$ , es la conductancia para el potasio en este caso.

La membrana permite el paso de iones a través de los canales iónicos que están formados por proteínas o lipoproteínas parcialmente hidratadas, los iones que se mueven a través de un canal pueden interaccionar con él, (nunca formando enlaces covalentes) en uno o más puntos durante su paso, por lo que aunque los iones se muevan en respuesta a un gradiente electroquímico, no siempre lo hacen de una forma lineal. Más aún, los canales se pueden encontrar en distintos estados conformacionales de forma que estén en reposo, activos, o inactivos. La activación de un canal único es un proceso estadístico que depende del potencial de membrana o de un activador químico. Una vez abierto, el canal se cierra en un tiempo que depende del canal y del voltaje. En los canales controlados por el voltaje, un cambio en el potencial de membrana provoca un cambio conformacional en el canal que lo abre. Esto es debido a la naturaleza proteica del canal que tiene partes cargadas dependiendo del gradiente eléctrico a través de la membrana. Estas partes se llaman puertas. Se han diferenciado dos clases de puertas: las de activación y las de inactivación. La mayoría de los canales son activados por una despolarización, con una cinética de activación que varía de unos canales a otros.

Los canales muestran selectividad entre iones, aunque no de un modo perfecto. El conocimiento de los canales se puede alcanzar mediante el estudio de las corrientes eléctricas provocadas por el paso de iones a su través. Ésto es posible gracias a los métodos de "patch-clamp" (ver sección métodos).

Una célula cardíaca (auricular o ventricular) en reposo tiene una diferencia de voltaje a través de su membrana, con el interior de la célula negativo con respecto al exterior, a esta diferencia de potencial se le llama potencial de reposo y varía entre -60 y -90 mV, según el tipo de célula. Ésto es debido, en parte, a que en el interior del miocito existe gran concentración de aniones orgánicos no difusibles. La naturaleza de los cationes está determinada por dos factores: la permeabilidad de la membrana a ellos y los sistemas de transporte que los mueven en contra de su gradiente electroquímico. Los cationes y aniones difusibles, como el NaCl, podrían pasar al interior celular. Sin embargo, la entrada de  $\text{Cl}^-$  resulta interferida por la presencia de grandes aniones no difusibles en el medio intracelular y la membrana en reposo es poco permeable al  $\text{Na}^+$ . Además, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se encarga de mantener baja la concentración intracelular de sodio, bombeándolo hacia el exterior a la vez que mueve  $\text{K}^+$  hacia el interior, con gasto de ATP. No es un transporte neutral, puesto que mueve 2  $\text{K}^+$  por cada 3  $\text{Na}^+$ , por lo que tiende a hacer electronegativo el interior de la célula con respecto al exterior, contribuyendo al potencial de reposo. Como resultado, el interior de la célula es rico en potasio y bajo en sodio, con respecto al medio extracelular.

Si a una célula cardíaca en reposo se le aplica una corriente despolarizante, el potencial de membrana se desplaza hacia valores cada vez menos negativos. Según la analogía de la membrana celular con una resistencia y capacitancia en paralelo, la aplicación de una corriente constante a la célula, de forma que cruce la membrana, cargará la capacitancia hasta alcanzar un potencial que, según la ley de Ohm ( $V=RI$ , donde  $V$  es la diferencia de potencial,  $R$  la resistencia al paso de corriente, e  $I$  la corriente eléctrica), será proporcional a la corriente aplicada y a la resistencia de la membrana. Cuando la magnitud de la corriente y/o el tiempo de aplicación hace que la célula alcance un cierto potencial crítico (llamado umbral), rápidamente cambia su potencial hasta un valor

positivo, que puede estar alrededor de +50 mV, y regresa a su estado de reposo repolarizándose. A este cambio en el potencial de membrana se le llama potencial de acción. Si la corriente aplicada es mayor, el tiempo para alcanzar el umbral será más corto, pero la respuesta será siempre igual en cada célula.

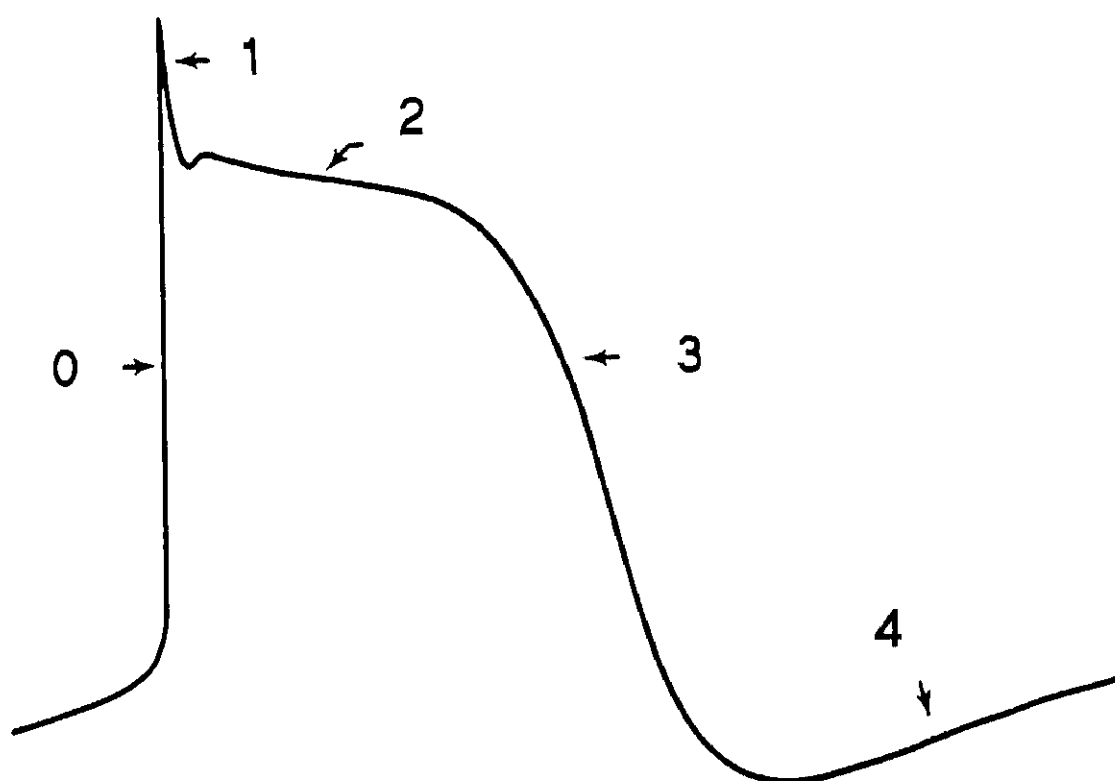
El potencial de acción es clave para la contracción del músculo cardíaco. Desde antiguo se sabe que la despolarización de la célula produce una contracción fásica (Fozzard y Hellam, 1968). Además del cambio en el potencial, es muy importante para la contracción el calcio intracelular, que interacciona con las miofibrillas. Como veremos después, durante el potencial de acción entra calcio en el miocito cardíaco. Éste calcio, junto con el liberado desde el retículo sarcoplásmico, se une a la troponina C que interacciona con la troponina I y T, y la tropomiosina, para descubrir sitios en el filamento fino de la actina a los cuales se podrán ligar las cabezas de los filamentos gruesos de la miosina, acortando las sarcómeras y desencadenando la contracción (Strobeck y Sonneblick, 1986).

### *Potencial de acción*

El potencial de acción es una despolarización súbita del potencial de membrana hasta valores positivos con la siguiente repolarización al potencial de reposo. El potencial de acción tiene cuatro fases (fig 4). El potencial de membrana resulta siempre de un equilibrio entre las corrientes entrantes o despolarizantes (fundamentalmente de sodio o calcio) y las corrientes de salida, repolarizantes o hiperpolarizantes (fundamentalmente potásicas). Si ambas corrientes permanecen iguales, el potencial de membrana se mantiene estable. Esto ocurre en el potencial de reposo o en la meseta de un potencial de acción excepcionalmente largo (fase 2). Cuando las corrientes de entrada predominan sobre las de salida, la célula se despolariza. Es el caso de la fase 0 ó de la lenta despolarización diastólica en las células automáticas (fase 4). Cuando las que predominan son las corrientes de salida, la célula se repolariza u ocasionalmente se hiperpolariza (fases 1 y 3). Secuencialmente, una célula permanece en reposo hasta que le llega un estímulo (excepto en el caso de células automáticas), en este momento, se va despolarizando hasta alcanzar

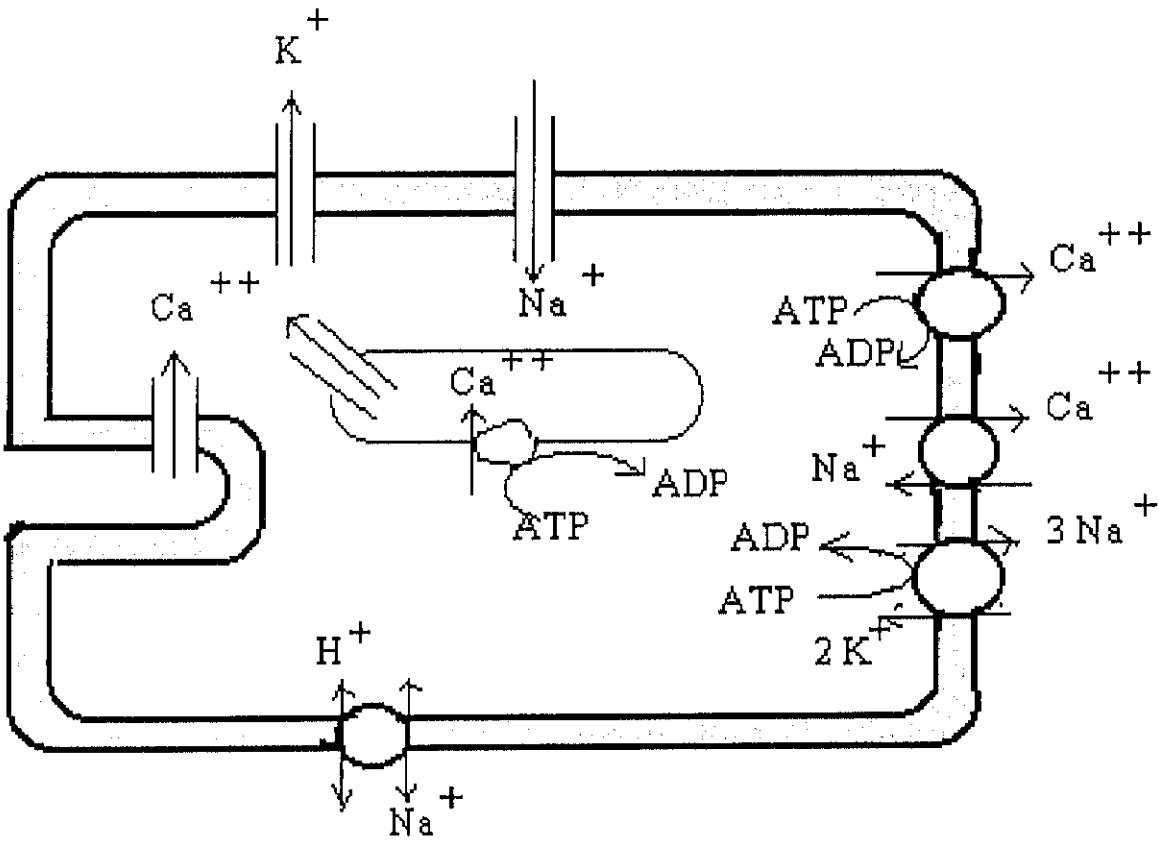
el potencial umbral, a partir de ahí, la célula se despolariza rápidamente hasta potenciales positivos (fase 0). A la parte positiva del potencial de acción se le llama overshoot. La fase 0 suele estar provocada fundamentalmente por una corriente de entrada de sodio. A continuación, la célula se comienza a repolarizar rápidamente al principio (fase 1), hasta mantenerse en un valor despolarizado o repolarizándose más lentamente (fase 2 ó meseta) y volviendo luego más rápidamente al potencial de reposo (fase 3). La repolarización se consigue fundamentalmente por corrientes de salida de potasio, en la fase 2 fluye una corriente de entrada de calcio, que hace más lenta la repolarización produciendo una meseta en el potencial de acción. Entre dos potenciales de acción, la célula mantiene su potencial de reposo, excepto en las células automáticas, que presentan una lenta despolarización diastólica (fase 4). Los movimientos iónicos que se han citado, están muy simplificados. En el momento actual se conocen muchas corrientes iónicas en las células cardíacas, algunas serán mencionadas más adelante. Pero como resultado de los movimientos iónicos en el cardiomiocito, al finalizar un potencial de acción, la célula tiene mayor contenido en sodio y calcio y menor en potasio. La concentración iónica vuelve a la situación de reposo gracias a las bombas de calcio que retiran este ión del citoplasma hacia el medio externo (la que se encuentra en la membrana del sarcolema) o hacia los reservorios (en la membrana del retículo sarcoplásmico). La bomba de calcio es esencial en la relajación (Hathaway y cols., 1989). Otro sistema de transporte que se encarga de mantener baja la concentración interna de calcio es el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Este sistema se encuentra en la membrana del sarcolema, intercambia 3  $\text{Na}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que es electrogénico. Su principal misión es mantener baja la concentración de calcio intracelular. Funciona en un sentido o en otro dependiendo del gradiente de sodio. También puede contribuir a la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, afectando el acoplamiento excitación-contracción (Niggli y Lederer, 1991). La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que ya mencionamos anteriormente por estar implicada en el potencial de reposo, mantiene la composición iónica intracelular alta en  $\text{K}^+$  y baja en  $\text{Na}^+$  (Gadsby, 1990) (ver fig. 5).

Una característica del potencial de acción cardíaco es su largo período refractario. En el tiempo en el que la meseta se mantiene, la célula no puede ser reexcitada, sea cual sea la magnitud del estímulo, porque en este momento los canales de corrientes de entrada



**Fig. 4:** Esquema de un potencial de acción típico de una célula de Purkinje. Modificado de Fozzard y Arnsdorf, 1986.





**Fig. 5:** Esquema representando los movimientos iónicos en una célula cardíaca.

se encuentran en estado inactivo. Durante la fase 3 comenzarán a pasar al estado de reposo y podrán ser nuevamente activados si el estímulo es mayor de lo normal, se dice que está en período refractario relativo. En las células auriculares, ventriculares y de Purkinje, la completa recuperación del potencial de reposo es suficiente para la completa recuperación de la excitabilidad. En el nodo senoauricular y auriculoventricular, el período refractario relativo se prolonga varios cientos de milisegundos después de la completa repolarización.

### *Corrientes iónicas*

Según la naturaleza de las corrientes iónicas que fluyen a través los canales de la membrana del cardiomiocito, se pueden dividir en una primera aproximación en: corrientes de sodio, calcio, potasio y cloro. De todas formas, recordamos que los canales tienen una selectividad relativa, es decir, dejan pasar mayoritariamente a un determinado ión, aunque también otros puedan pasar en menor proporción, contribuyendo a la corriente. Nos limitaremos a mencionar las principales corrientes encontradas en el miocito cardíaco, deteniéndonos un poco más sólo en las corrientes que hemos estudiado en esta tesis.

### **Corriente de sodio**

La corriente de sodio,  $I_{Na}$ , es una corriente de entrada que se activa e inactiva rápidamente y su principal función es la rápida despolarización que ocurre en la fase 0. También se ha postulado su implicación en la meseta del potencial de acción puesto que concentraciones de tetrodotoxina inferiores a las necesarias para bloquear este canal, acortan la meseta sin afectar a la velocidad de despolarización en la fase 0 (Kirsch y Brown, 1990).

### **Corrientes de calcio**

Observando la forma de la repolarización del potencial de acción cardíaco, se puede intuir que debe existir alguna corriente de entrada que mantenga la meseta. Después de que la teoría iónica empezara a desarrollarse, responsabilizando a las corrientes sódicas y

potásicas de las variaciones en el potencial de membrana (Hodgkin y Huxley, 1952), se encontraron potenciales de acción en una fibra muscular de crustáceo, en ausencia de sodio externo (Fatt y Katz, 1953). Después de los trabajos de Winwgrad y Shane (1962) fue generalmente aceptada la existencia de una entrada de calcio durante el potencial de acción cardíaco.

La membrana del sarcolema de muchas especies tiene dos tipos de canales de calcio, que comparten la alta sensibilidad por los iones cálcicos, pero se diferencian en otras propiedades (Bean, 1985; Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols, 1988) como el voltaje de activación e inactivación y en sus cinéticas. Estos canales son los llamados tipos L y T.

-  $I_{Ca,L}$ : La L proviene de su cinética lenta, en comparación con la corriente de sodio, y su gran conductancia en comparación con la otra corriente de calcio (del inglés *long-lasting* y *large conductance*). Esta corriente de entrada contribuye a la duración del potencial de acción (fase 2) y al período refractario en todas las células cardíacas, a la lenta despolarización diastólica y al ritmo en las células marcapasos, y a la fase 0 y a la velocidad de conducción en las células nodales. Más aún, el  $Ca^{2+}$  que entra a través de estos canales es esencial para el acoplamiento excitación-contracción puesto que inician la contracción al inducir la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Fabiato, 1983; Hess, 1990).

Esta corriente depende del tiempo y del voltaje. La curva que representa la corriente en función del voltaje tiene forma de "V" (Trautwein, 1973; Isenberg y Klöchner, 1982), empezándose a activar a potenciales positivos a -20/-40 mV, alcanzando un pico de máxima corriente alrededor de 0/+10 mV y con un potencial de reversión cercano a +60 mV. El pico de activación se alcanza en un tiempo inferior a 10 ms, variando según el voltaje, y la inactivación en 10-20 ms, que puede tener una cinética biexponencial con una constante de inactivación rápida alrededor de 30 ms y otra lenta de 50 ms aproximadamente. En células humanas estos parámetros son similares (Bénitah y cols, 1992a). Los valores obtenidos dependen de las condiciones experimentales, tales

como el potencial al que se fija la membrana, la temperatura y la concentración de iones a ambos lados de la membrana, por lo que los indicados anteriormente se tomarán como orientativos.

La activación en estado estacionario de esta corriente presenta una forma sigmoideal, con un umbral de activación de -40 a -20 mV y una pendiente del orden de 7 (Isenberg y Klöckner, 1982). La dependencia de la disponibilidad de la  $I_{Ca,L}$ , en función del potencial (inactivación en estado estacionario), tiene una forma sigmoideal, que va desde -50 mV a +10 mV, con un potencial de semiinactivación entre -20 y -30 mV y una pendiente entre -0 y -11 (Isenberg y Klöckner, 1982; Josephson y cols., 1984a). Sin embargo, esta inactivación no es completa para potenciales positivos a +20 mV. Ésto puede ser debido en parte a la superposición de las curvas de activación e inactivación en estado estacionario (Trautwein y cols., 1975), también llamado corriente de "ventana". De hecho existen dos mecanismos de inactivación de estos canales cálcicos: uno dependiente del potencial y otro dependiente del mismo ión calcio (Kohlhard y cols., 1975; Josephson y cols., 1984a). Los estudios realizados en canal único confirmaron que la inactivación de la  $I_{Ca,L}$  es un proceso que depende del potencial y del calcio (McDonald y cols., 1986).

El potencial de reversión ([+60]-[+70] mV) es inferior al esperado según el potencial de equilibrio calculado por la relación de Nerst (+130 mV), esto indica que estos canales además del calcio dejan pasar otros iones, aunque en menor proporción, como el potasio y el sodio (Lee y Tsien, 1982; Hess y Tsien, 1984). El canal, inactivado por la despolarización de la membrana, puede volver a un estado disponible en la repolarización. El proceso de reactivación se ha descrito de forma monoexponencial (Isenberg y Klockner, 1982), biexponencial (Josephson y cols., 1984a) y oscilatorio (Tseng, 1988). En este proceso se induce un aumento transitorio de la corriente de calcio por encima del valor control. Este fenómeno depende del potencial y posiblemente de la concentración intracelular de calcio (Tseng, 1988; Richard y cols., 1993).

Estos canales dejan pasar otros iones divalentes como el  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , y son bloqueados por  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{La}^{2+}$ , o fármacos antagonistas de calcio como el verapamil y el D600. Siendo sensibles a los  $\beta$ -agonistas, que inducen un aumento en esta corriente.

Todas la células excitables contienen canales de calcio, la mayoría de ellos en las invaginaciones de la membrana (Hille, 1984). El canal de calcio tipo L es el clásico canal cardíaco investigado por gran número de investigadores en el pasado. Por sus cinéticas, debe ser el principal canal encargado de mantener la corriente de entrada en la meseta del potencial de acción cardíaco. Por su relativamente positivo potencial de inactivación, el canal tipo L puede determinar la frecuencia de los potenciales de acción que ocurren en las células parcialmente despolarizadas del nodo auriculoventricular, conclusión que se confirma por el hecho de que estas células son muy sensibles a antagonistas de calcio específicos. Además, estos canales son capaces de proporcionar el calcio necesario para la contracción, dado que se pueden ver transientes intracelulares de calcio normales (incrementos transitorios en la concentración de calcio necesarios para la contracción de las células, provocados por la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico a consecuencia de una entrada de calcio desde el exterior de la célula) y contracciones a un potencial de membrana en el cual los canales tipo T están inactivados (Wier e Isenberg, 1982) además en las células ventriculares adultas de algunas especies, entre ellas la rata, no se han encontrado canales tipo T (Richard y cols., 1990). De ahora en adelante, cuando hablemos de  $I_{\text{Ca}}$  sin especificar, nos referiremos a la corriente lenta de entrada de calcio, tipo L.

-  $I_{\text{Ca,T}}$ : La T proviene de su cinética más rápida y menor conductancia (del inglés *tiny conductance* y *transient current*). Este canal se activa e inactiva a potenciales más negativos que el tipo L. Se bloquea con  $\text{Ni}^{+}$  y es poco sensible a las dihidropiridinas. Se le ha implicado en el umbral del potencial de acción de las células auriculares, ventriculares y de Purkinje y en la última fase de la lenta despolarización diastólica en las células senoauriculares (Hagiwara y cols., 1988).

- Además de las dos corrientes cálcicas anteriores, en la membrana del retículo sarcoplásmico se han encontrado canales de calcio, activados por un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e inhibidos por la ryanodina. Son esenciales en el acoplamiento excitación-contracción (Meissner, 1990).

### **Corrientes de potasio**

Las corrientes de potasio forman una gran familia, que puede ser dividida en dos grupos según los canales implicados estén activados por el voltaje o por ligandos (Carmeliet, 1989).

#### Canales controlados por el voltaje

-  $I_K$ : Es la llamada corriente potásica retardada. Es una corriente de salida y tiene importancia en la segunda parte de la fase 2 del potencial de acción, poniendo fin a la meseta. Fue descrita por Hodgkin y Huxley en 1952, su activación es lenta y, aunque hasta hace poco se pensaba que no se inactivaba, se ha demostrado que se inactiva rápidamente aunque de una forma incompleta (Shibasaki, 1987). En corazones humanos sólo se ha registrado esta corriente en menos de la mitad de las células ventriculares de corazones con insuficiencia cardíaca terminal, y no en corazones controles (Beuckelmann y cols., 1993).

-  $I_{to}$ : Es la corriente transitoria de salida (el nombre de "to" viene del inglés *transient outward*). Se llama transitoria porque es una corriente que se activa e inactiva muy rápidamente. La densidad de su canal difiere según la localización de la célula en el músculo cardíaco, la especie y la edad (Escande y cols., 1985). Esta corriente juega un papel muy importante en la fase 1 del potencial de acción. En el momento actual se conoce la existencia de dos componentes de la  $I_{to}$ , uno activado por el voltaje y sensible a la 4-aminopiridina (4-AP), y otro activado por calcio intracelular al que nos referiremos más tarde, en la sección de los canales activados por ligandos. En 1964 Deck y Trautwein sugirieron que la fase 1 del potencial de acción estaba provocada por una corriente de

salida que se activa e inactiva muy rápidamente a potenciales positivos a  $-20$  mV. Durante bastante tiempo se creyó que esta corriente era específica de las células conductoras y sin importancia en las células ventriculares (Beeler y Reuter, 1977). A principios de los 80, se sugirió que una corriente transitoria de salida estaba presente en células ventriculares (Saxon y Safronova, 1982). Más tarde se observó esta corriente en células ventriculares de rata, sugiriendo que era la responsable de la repolarización rápida del potencial de acción en estas células (Mitchel y cols., 1984, Josephson y cols., 1984b), en el ventrículo de cobayo no existe esta corriente (Josephson y cols., 1984b). Por el contrario, en células ventriculares humanas esta corriente sí está presente (Näbauer y cols., 1993).

Se sugirió que esta corriente tiene dos componentes, uno de cloro, y otro de potasio sensible a la 4-aminopiridina (4-AP) (Kenyon y Gibbons, 1979). También se habló de una corriente transitoria de salida activada por el calcio (Siegelbaum y Tsien, 1980). Al final se llegó a la conclusión de que existen dos componentes distintas de la corriente transitoria: uno lento que se bloquea por la 4-AP, y otro rápido que se activa por el calcio intracelular (Coraboeuf y Carmeliet, 1982). Se ha demostrado la coexistencia de las dos componentes en células de conejo (Giles e Imaizumi, 1988), de perro (Tseng y Hoffman, 1989) y gato (Furukawa y cols., 1990a). En otras especies como la rata sólo el componente independiente de calcio ha sido encontrado, aunque aquí también se ha demostrado la existencia de un componente mantenido insensible a la 4-AP (Apkon y Nerbonne, 1991). Como ahora estamos tratando las corrientes de potasio controladas por el voltaje y no por los ligandos, nos referiremos a la corriente transitoria de salida sensible a 4-AP de células ventriculares, también llamada  $I_{to,1}$ .

La  $I_{to}$  sensible a la 4-AP se activa a potenciales positivos a  $-30$  mV, siendo esta activación muy rápida, de 2 a 10 ms, con los valores menores a potenciales más despolarizados. La inactivación es algo más lenta, y sigue un curso monoexponencial con una constante de tiempo de 20 a 50 ms, que no depende del potencial (Apkon y Nerbonne, 1991; Josephson y cols., 1984b), o biexponencial que sí depende del voltaje (Hiraoka y Kawano, 1989). La curva que representa la corriente en función del voltaje es de forma lineal, aumentando progresivamente con la despolarización. Su densidad puede depender

de la especie, diferencias regionales, edad y frecuencia de estimulación (Josephson y cols., 1984b; Kilborn y Fedida, 1990; Antzelevitch y cols., 1991; Fedida y Giles, 1991). La activación y la inactivación en estado estacionario tienen forma sigmoidal, siendo muy variables los potenciales encontrados que definen esas curvas. Por ejemplo, en células de rata se ha descrito que el potencial al cual se produce el 50% de inactivación varía entre -37 y -57 mV (Josephson y cols., 1984b; Apkon y Nerbonne, 1991).

La cinética de recuperación de la inactivación depende del voltaje y varía según los estudios. Por ejemplo en la rata, se ha descrito la reactivación como una monoexponencial con constante de tiempo de 20 a 40 ms (Josephson y cols., 1984b), o como biexponencial una constante rápida de 20 ms y una lenta de 50 ms aproximadamente (Apkon y Nerbonne, 1991).

Los potenciales de activación de la  $I_{to}$  coinciden en parte con los de la  $I_{Ca,L}$ , determinando así la duración del potencial de acción. Los efectos repolarizantes de la corriente transitoria que tienden a acortar la duración del potencial de acción, se contrarrestan con los despolarizantes de la de calcio que tienden a alargarlo. Siendo el equilibrio entre estas dos corrientes el determinante, al menos en parte, de la duración del potencial de acción. La duración del potencial de acción depende de la magnitud y cinéticas de las corrientes implicadas en la repolarización. La corriente lenta de entrada de calcio ( $I_{Ca,L}$ ) y la transitoria de salida de potasio ( $I_{to,I}$ ), juegan un papel importante en la repolarización del potencial de acción cardíaco de la rata (Mitchell y cols., 1984). Puesto que la  $I_{Ca}$  es una corriente despolarizante, cuanto mayor sea o más lento se inactive, más tardará la célula en repolarizarse y mayor será la duración del potencial de acción. En el caso de la  $I_{to}$ , una disminución de esta corriente enlentecería la repolarización, incrementando la corriente neta de entrada y prolongando la duración del potencial. Lo contrario ocurriría en caso de un aumento de la  $I_{to}$ . Mitchell y cols. (1984) analizaron la duración del potencial de acción en células aisladas procedentes de ventrículos de rata. Cuando añadieron al líquido de perfusión estroncio, que prolonga la  $I_{Ca,L}$ , vieron un incremento en la duración del potencial de acción; mientras que observaron lo contrario en presencia de un bloqueante de calcio como es la nifedipina. Para conocer la implicación



de la  $I_{to}$  en la duración del potencial de acción, estos investigadores, en otras células, añadieron al líquido de perfusión un bloqueante de la  $I_{to}$ , la 4-AP y observaron de nuevo una prolongación de la duración del potencial de acción.

- $I_{Kp}$ : La "p" viene de su importancia en la meseta (*plateau*) del potencial de acción. Es una corriente de salida que se activa muy rápidamente en respuesta a una despolarización (Yue y Marbán, 1988; Backx y Marbán, 1993). Ejerce un efecto repolarizante durante toda la meseta, siendo más marcada para despolarizaciones pronunciadas.

- $I_{K1}$ : Se le llama 1 porque fue la primera corriente potásica estudiada en el músculo cardíaco. Durante mucho tiempo se le ha considerado una corriente de fondo (*background*). Las corrientes de fondo son las que no dependen del tiempo. El principal papel de esta corriente es el mantenimiento del potencial de reposo, pero también está implicada en el potencial de acción, impidiendo que se alargue demasiado, está involucrada en la repolarización del potencial de acción, especialmente en la última fase (Pennefather y Cohen, 1990).

Esta corriente se activa muy rápidamente en respuesta a una hiperpolarización (Kurachi, 1985). Tiene una rectificación de entrada, esto significa que el canal deja pasar más fácilmente  $K^+$  al interior de la célula a determinados voltajes. También posee una región de pendiente negativa a potenciales positivos al de equilibrio del potasio, lo que asegura que la corriente de salida que pasa a través de estos canales es reducida a voltajes 20 mV positivos al potencial de equilibrio de potasio, y así se evita una acumulación masiva de potasio en los estrechos espacios extracelulares y el acortamiento excesivo de la duración del potencial de acción (Shah y cols., 1987; Pennefather y Cohen, 1990). Se bloquea por distintos iones monovalentes y divalentes, entre los que se encuentra el  $Ba^{2+}$  y el  $Cs^{2+}$  (Isenberg, 1976; Di Francesco y cols., 1984), pudiendo ser utilizada la diferencia entre antes y después del bloqueo, para medir la relación corriente-voltaje de la  $I_{K1}$ . Las primeras investigaciones se realizaron en preparaciones multicelulares, en las cuales, se tardaba en alcanzar el potencial impuesto varios milisegundos y los espacios extracelulares eran reducidos, por lo que no se investigaron las propiedades cinéticas de

esta corriente, pensando que no era una corriente dependiente del tiempo (se pensaba que era de fondo). Sin embargo, con los estudios en célula aislada se vio que este concepto no era del todo correcto.

La  $I_{K1}$  se activa en la hiperpolarización y, se inactiva a los potenciales más hiperpolarizados (Biermans y cols., 1987). La activación es tiempo-dependiente, a 32°C la activación es casi completa a 10 ms (Harvey y Ten Eik, 1988). La curva de activación de la  $I_{K1}$  en función del voltaje varía cuando se altera la concentración extracelular de potasio (Harvey y Ten Eik, 1988; Cohen y cols., 1989). Es posible que los canales de esta corriente sean un ejemplo de canales de potasio activados por potasio (Cohen y cols., 1989; Pennefather y cols., 1992).

La corriente  $I_{K1}$ , además de ser importante en el mantenimiento del potencial de reposo, juega un papel importante en el establecimiento de la meseta y en la fase 3 del potencial de acción (Surawicz, 1992), de hecho, se ha visto que un bloqueante de este canal, prolonga la duración del potencial de acción al 50 y 90 % de repolarización (Martin y Chin, 1992). Esta corriente ha sido registrada recientemente en células ventriculares humanas (Beuckelman y cols., 1993). También se ha sugerido que el número de canales de  $I_{K1}$  por célula es diferente en células procedentes del epicardio y del endocardio (Furukawa y cols., 1992).

### Canales controlados por ligandos

-  $I_{to(Ca)}$ : Además de la  $I_{to}$  controlada por el voltaje, la corriente transitoria de salida total tiene un segundo componente (menor en amplitud), activado por el calcio intracelular. Este calcio procede de la corriente  $I_{Ca}$  y del calcio liberado desde el retículo sarcoplásmico. Es sensible a la cafeína, que bloquea la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y al manganeso que inhibe la  $I_{Ca}$  (Coraboeuf y Carmeliet, 1982). Contribuye a la repolarización inicial del potencial de acción provocada por la corriente transitoria dependiente del voltaje.

-  $I_{K(ACh)}$ : Es una corriente potásica de salida cuyo canal se activa por acetil-colina. Este canal se ha encontrado en las células de los nodos senoauricular y auriculoventricular, de Purkinje y auriculares, pero es raro en los ventrículos de mamíferos. A consecuencia de su activación se produce una hiperpolarización, responsable de la bradicardia en el nodo y de un acortamiento en el potencial de acción en las células de Purkinje y auriculares. Es parcialmente transitoria, fenómeno que se le ha llamado desensibilización y que se podría considerar como un proceso de inactivación. Este canal también puede ser activado por adenosina (Bernardinelli e Isenberg, 1983), aumento del ATP extracelular (Friel y Bean, 1988) y receptores  $\alpha$  (Kurachi y cols., 1989).

-  $I_{K(FA)}$ : El canal de potasio a través del cual pasa esta corriente se activa por el ácido araquidónico, otros ácidos grasos y fosfolípidos (el FA de su nombre viene de ácidos grasos en inglés, *fatty acids*). Muestra rectificación de salida y es muy sensible al pH, siendo mucho mayor a pH ácido (Kim y Claphan, 1989).

-  $I_{K(ATP)}$ : Sus canales se activan por una bajada en los niveles de ATP intracelular (Lederer y Nichols, 1989). Probablemente sólo se activen en el músculo cardíaco en condiciones patológicas, produciendo un acortamiento del potencial de acción.

-  $I_{K(Na)}$ : Es una corriente de salida de alta conductancia que se activa por el sodio citoplasmático (Luk y Carmeliet, 1990). Sólo se activa, por tanto, cuando la bomba  $Na^+/K^+$  está bloqueada (por ejemplo con digitálicos) o cuando se produce un aumento masivo de  $Na^+$  por intercambio con  $H^+$  (existe un intercambiador  $Na^+/H^+$  en la membrana de las células cardíacas) en el caso de isquemia.

## Corrientes de cloro

Hasta hace poco, no se daba importancia a la contribución de las corrientes de cloro a la actividad eléctrica cardíaca. Sin embargo, la actividad intracelular de cloro es superior a la que se podría predecir si fuera distribuida pasivamente. A potenciales cercanos al potencial de reposo la conductancia al cloro es baja, pero incrementa bastante durante la

despolarización (Hume y Harvey, 1991). Durante los años 70 se creyó que el principal ión transportador de carga en la corriente transitoria de salida, responsable de la fase 1 del potencial de acción, era el cloro, puesto que se observó que esta corriente se reducía cuando el cloro externo era sustituido con otros aniones no permeables. Se le llamó corriente dinámica positiva (Peper y Trautwein, 1968). Kenyon y Gibbons (1977) mostraron que el hecho de reemplazar el cloro altera la actividad del calcio externo, sugiriendo que las observaciones anteriores no indicaban que el ión implicado en el componente de la corriente transitoria sensible a calcio fuera el cloro, y que en condiciones en las que se mantiene constante la actividad extracelular de calcio, la sustitución del cloro externo producía poco cambio en la fase 1 del potencial de acción. Últimamente está volviendo a resucitar la teoría de una corriente transportada por cloro sensible a calcio, puesto que se ha encontrado que el componente sensible a calcio de la corriente transitoria se bloquea por inhibidores del transporte aniónico (Zygmunt y Gibbons, 1991).

Puesto que el potencial de reversión del cloro, en condiciones fisiológicas, es de -50 mV aproximadamente, este ión podría contribuir a las corrientes de salida en el potencial de acción, y a las de entrada en el potencial de reposo. Recordemos que por ser el  $\text{Cl}^-$  un anión, las corrientes de salida o repolarizantes coinciden con la entrada en la célula del anión y las de entrada o despolarizantes, con la salida del mismo.

Se han aislado dos canales distintos de  $\text{Cl}^-$  a partir de la membrana sarcoplásmica y del retículo sarcoplásmico humano (Hill y cols., 1989) y en células ventriculares de rata neonata (Coulombe y cols., 1987). A pesar de ello, no está del todo claro si existen múltiples canales de cloro en el corazón, o si un sólo tipo de canal puede ser activado por múltiples mensajeros. Teniendo en cuenta su modulación, podríamos hablar de una corriente de cloro, modulada por el  $\text{AMP}_c$ ,  $I_{\text{Cl,AMPc}}$ , esta corriente de cloro, no depende del tiempo, muestra rectificación de salida, y resulta inducida por isoproterenol. La inducción de esta corriente por isoproterenol, se revierte con acetilcolina, lo que indica una modulación muscarínica. La activación de esta corriente produce un acortamiento del potencial de acción, atribuyéndose este efecto a un papel atenuador del alargamiento del mismo, debido al incremento de  $I_{\text{Ca}}$  inducido por isoproterenol. También está implicada

en el potencial de reposo (Harvey y Hume, 1989a y 1989b; Harvey y cols., 1990; Hume y Harvey, 1991). Se ha observado que la activación de esta corriente por isoproterenol y su inhibición por acetilcolina están mediadas por proteínas G (Horie y cols., 1992). La curva corriente-voltaje muestra que esta corriente tiene una rectificación de salida, con un potencial de reversión cercano al predicho por el equilibrio electroquímico del cloro (alrededor de -40 mV). Esta corriente se ha observado en cobayo, conejo y gato, y en células auriculares y de Purkinje de perro, pero no en las células ventriculares de éste último animal (Hume y Harvey, 1991).

Se ha encontrado una corriente que también parece ser de cloro, con rectificación de salida e independiente del tiempo, que se activa cuando se estimula la proteína quinasa C. En presencia de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico, la noradrenalina activó una corriente de características similares, por lo que se dedujo que la activación  $\alpha$ -adrenérgica regula una corriente de cloro activada por proteína-quinasa C (Walsh, 1991).

En células ventriculares de cobayo, la exposición extracelular a ATP, un análogo suyo no hidrolizable, ADP, AMP y adenosina activó una corriente de cloro, también independiente del tiempo y con rectificación de salida, indicando que la corriente de cloro puede ser activada por vía purinérgica (Matsuura, y Ehara, 1992).

Recientemente se ha estudiado una corriente aniónica que se activa por estiramiento, ejerciendo una presión en el interior de la célula, a través del electrodo, de forma que la célula "se hinche". Esta corriente se redujo en presencia de bloqueantes de cloro, pero no en presencia de bloqueantes de proteína quinasas no específica o dependiente de  $AMP_c$  (Hagiwara y cols., 1992). El trabajo anterior fue realizado en células del nodo senoauricular y auriculares de conejo. En células auriculares y ventriculares de perro también se ha encontrado una corriente de cloro que se activa por la distensión de la membrana celular, provocados por cambios osmóticos, incrementando la osmolaridad intracelular o bañando a las células con una solución hipotónica (Sorota, 1992; Tseng, 1992). Esta corriente muestra en su curva corriente-voltaje que tiene rectificación de salida, con un potencial de reversión alrededor de -60 mV, no es sensible a inhibidores de

la proteín-quinasa. Esta corriente puede estar asociada a situaciones patológicas que conllevan un incremento en el volumen celular. En ratas neonatas también se ha encontrado una corriente de cloro que se induce en medio hipotónico, sugiriendo un papel de estos canales en la regulación del volumen en células jóvenes. No se ha encontrado en células de ratas adultas (Coulombe y Coraboeuf, 1992).

### *Heterogeneidad de las propiedades eléctricas en el ventrículo*

A pesar de los grandes avances en cardiología durante los últimos años, el tratamiento de las arritmias cardíacas continúa siendo un experimento de ensayo-error. El problema deriva del incompleto conocimiento de los mecanismos por los cuales los antiarrítmicos suprimen o agravan las arritmias. El diagnóstico diferencial de arritmias cardíacas requiere un conocimiento de las características electrofisiológicas de las células y tejidos del corazón incluyendo qué clase de heterogeneidad o especialización existe. La capacidad para diseñar tratamientos específicos depende del entendimiento de la distinta respuesta farmacológica de las distintas células del corazón.

En el músculo cardíaco existen 5 tipos de células que se diferencian en su función y localización: nodo senoauricular, nodo auriculoventricular, sistema His-Purkinje (células de Purkinje), músculo auricular y músculo ventricular. Los tres primeros muestran propiedades marcapasos, es decir, son capaces de presentar potenciales de acción autoinducidos, de forma regular. Estas células automáticas se caracterizan por tener una despolarización lenta y progresiva en el intervalo entre potenciales de acción, por lo que en ellas no se puede hablar de un potencial de reposo como tal.

Hasta no hace mucho, la mayoría de las investigaciones de electrofisiología y farmacología de los ventrículos se referían a dos tipos de células: de Purkinje y ventriculares. Sin embargo, dentro del último grupo, la duración del potencial de acción varía no sólo dependiendo de la especie estudiada, sino que dentro del mismo corazón lo hace según la procedencia regional de la célula en cuestión. Desde hace bastante tiempo, basándose en las características del electrocardiograma, se sospechó que la duración del

potencial de acción sería más corto en el epicardio que en el endocardio (Cohen y cols., 1976). Posteriores estudios confirmaron esta idea en humanos (Franz y cols., 1987). Varios estudios realizados en perro (Sicouri y cols., 1991; Krishnan y cols., 1991) han demostrado que la duración y la forma del potencial de acción es distinta en epicardio y en endocardio, siendo la duración del potencial de acción más corta en las células del epicardio, con una fase 1 más marcada, y una meseta en forma de cúpula. Además han encontrado otro tipo celular en el subepicardio profundo, las células M, que tienen características intermedias entre las células ventriculares y las conductoras. También se han visto diferencias en la duración y características del potencial de acción, tales como respuesta a cambios fisiopatológicos, frecuencia de estimulación y a sustancias farmacológicas, en ventrículos de oveja y ternero (Beeler y Reuter, 1977), rata (Keung y Aronson, 1981; Watanabe, 1983), gato (Kimura y cols., 1986 y 1987; Furukawa y cols., 1990a y 1992), cobayo (Watanabe y cols., 1985) y conejo (Fedida y Giles, 1991). Antzelevitch (1991) sugirió que las diferencias observadas en los potenciales de acción eran debidas a la diferente distribución de la corriente transitoria de salida de potasio, que sería prominente en epicardio y pequeña en endocardio. Recientemente (Liu y cols., 1993) han demostrado que no había diferencias en la  $I_{K1}$ , pero sí en la corriente transitoria de salida, la cual era significativamente más importante en las células de epicardio y células M que en las de endocardio. Watanabe y cols. (1983) demostraron que las células ventriculares aisladas de rata se podían agrupar en tres diferentes grupos tomando como criterio la duración del potencial de acción. Él sugirió que esta heterogeneidad en la duración del potencial de acción, estaría relacionada con una distribución distinta, según la procedencia regional de las células, de las principales corrientes implicadas en la repolarización del potencial de acción en la rata: la  $I_{to}$ , la  $I_{Ca}$ , y/o la  $I_{K1}$ .

Varios estudios han sugerido que la corriente responsable de esta heterogeneidad en la duración del potencial de acción era la corriente transitoria de salida. En células de gato (Furukawa y cols., 1990a) propusieron que las células de epicardio tienen una  $I_{to}$  más importante; en los miocitos ventriculares de conejo, se encontró que había una disminución progresiva de la corriente transitoria, desde el epicardio hacia el endocardio. Los estudios en canal único llevaron a la conclusión de que la diferencia observada no era debida a las

características del canal, sino a la distinta densidad de estos canales en las membranas de las células de epicardio y endocardio (Fedida y cols., 1991). Recientemente, en células aisladas de ventrículo de perro, Liu y cols. (1993), han demostrado que las células del endocardio tienen una menor  $I_{to}$ , en comparación con las células del endocardio y midmiocardio.

También se han sugerido diferencias en otras corrientes de potasio. Se han encontrado diferencias en la corriente de rectificación de entrada,  $I_{K1}$ , entre las células de endocardio y epicardio en los miocitos ventriculares de gato, esta corriente era mayor en el endocardio que en el epicardio (Furukawa y cols., 1992). Sin embargo, otras investigaciones en células de perro no encontraron diferencia en esta corriente (Liu y cols., 1993). Respecto a la  $I_K$ , se ha encontrado que era más importante en el epicardio que en el endocardio, por poseer las primeras mayor número de canales y con mayor probabilidad de apertura (Furukawa y cols., 1992). Los canales de  $I_{K,ATP}$  de epicardio muestran mayor sensibilidad a las variaciones de ATP intracelular que los de endocardio (Furukawa y cols., 1991), explicando de esta forma su respuesta distinta a la isquemia.

Las diferencias observadas con verapamil entre las células de epicardio y endocardio (Kimura y cols., 1987), podrían sugerir una diferencia en la  $I_{Ca}$ , sin embargo, estos mismos autores no encontraron diferencia en la corriente de calcio, aunque notaron una disminución de la  $I_{Ca}$  en la inhibición metabólica (Kimura y cols., 1991).

El bloqueo de los canales de sodio produce efectos distintos en el epicardio y en el endocardio de perro (Krishnan y Antzelevitch, 1991). Más tarde, se ha mostrado que la corriente de sodio de los miocitos ventriculares de gato, era mayor en el endocardio que en el epicardio (Kimura y cols., 1992).

#### 2.2.4.2.- *Electrofisiología del corazón hipertrófico*

Como hemos indicado anteriormente, los corazones hipertróficos, tienen alterada la contracción y sufren con mayor frecuencia arritmias. Este hecho hizo pensar que las



características electrofisiológicas de los miocitos cardíacos podrían estar alteradas. De hecho, Bassett y Gelband (1973), y Tritthart y cols. (1975), utilizando un modelo experimental de hipotrofia cardíaca por oclusión de la arteria pulmonar en gato, observaron que la duración del potencial de acción estaba aumentado en relación a los corazones controles. Similares resultados fueron obtenidos por Hayashi y Shibata (1974) en el corazón de rata espontáneamente hipertensa. Después de estas primeras observaciones, casi todos los estudios coincidieron en afirmar que la presencia de hipertrofia cardíaca se acompaña de un alargamiento de la duración del potencial de acción y éste es un hecho constante independientemente del modelo experimental utilizado. Por ejemplo, hipertrofia derecha de gato por estenosis de arteria pulmonar (Nuss y Houser, 1991), en hámster sirio (Rossner y Sachs, 1978; y Capasso y cols., 1989); en rata hipertensa por estenosis de la arteria renal (Aronson, 1980; Keung y Aronson, 1981; Gülch y cols., 1979 y 1983; Aronson y cols., 1984), de la aorta (Scamps y cols., 1990; Kohya, 1988), inyección de DOCA (Heller y Stauffer, 1979), infartadas por ligadura coronaria izquierda (Thollon y cols., 1989) o en cobayo con hipertrofia ventricular izquierda por oclusión de la aorta ascendente (Nordin y cols., 1989).

El mecanismo responsable de este alargamiento de la duración del potencial de acción podría ser, o bien una disminución de las corrientes de salida, o bien un incremento en las corrientes de entrada que fluyen durante la repolarización, o ambas alteraciones a la vez. También una alteración en las cinéticas de estas corrientes podría contribuir al incremento en la duración del potencial de acción descrito en los corazones hipertróficos.

Los corazones hipertróficos tienen deprimida la contracción y la relajación es más lenta. Estas alteraciones mejoraban con la administración de antagonistas de calcio (Bonow y cols., 1981), por lo que se pensó que posiblemente los cardiomiocitos hipertróficos tuvieran alterada la corriente de calcio. Sin embargo, los estudios realizados sobre la corriente lenta de entrada  $I_{Ca}$ , son muy contradictorios. Por una parte, algunos resultados han indicado un aumento en la  $I_{Ca}$ , lo que podría explicar un aumento en la duración del potencial de acción. Los primeros trabajos indicaron que la  $I_{Ca}$  estaba alterada en su inactivación, siendo más lenta en células procedentes de corazones hipertróficos (Gülch y

cols., 1979; Aronson, 1980; Gülch, 1983). Ferry y Kaumann (1987) encontraron un aumento en la densidad de los canales de calcio en el tejido septal de pacientes con hipertrofia cardíaca, al compararlo con el músculo papilar. Keung (1989) estudió la corriente  $I_{Ca}$  de células aisladas corazones hipertróficos de ratas por un modelo de hipertensión renovascular (estenosis de la arteria renal, Goldblatt), y observaron que tanto la magnitud de  $I_{Ca}$  en valores absolutos, como su densidad estaban aumentadas en células hipertróficas. Además estudió el curso temporal de la inactivación, observando que la constante lenta de inactivación estaba incrementada, es decir, la corriente tardaba más tiempo en inactivarse. No encontraron ninguna alteración en la inactivación en estado estacionario. Hay que indicar que escogió las células hipertróficas más pequeñas, con tamaños similares a las controles. Otros resultados en células ventriculares hipertróficas por estenosis de la arteria pulmonar (Kleiman y Houser, 1988) o aorta (Furukawa y cols., 1990b) de gato no encontraron variación en la densidad de la corriente de calcio, pero sí observaron un enlentecimiento en la constante lenta de la inactivación. Por otro lado, si bien el número de canales de calcio tipo L (medidos como receptores de dihidropiridinas) estaban aumentados en un modelo de hipertrofia por estenosis aórtica en rata (Mayoux y cols., 1988) y en cobayo (Primot y cols., 1991), la densidad permanecía constante. Estos resultados están apoyados por los resultados de Scamps y cols. (1990) en células ventriculares hipertróficas por estenosis de la aorta abdominal en rata, donde se confirmó que si la amplitud de la  $I_{Ca}$  en las células hipertróficas era mayor, era debido a la mayor superficie de membrana, pero la densidad de corriente permanecía inalterada. Estos autores tampoco encontraron diferencias significativas en la cinética de la corriente, ellos explicaron sus diferencias con los resultados de Keung y cols. sugiriendo que quizá en el proceso de hipertrofia, primero se induzca un incremento en la síntesis de canales de calcio y luego el crecimiento de la membrana celular. Frente a estos resultados, otros investigadores han encontrado una disminución en la amplitud de  $I_{Ca}$  sin variación en su cinética (Ten Eik y cols., 1983). En células de hurón hipertróficas por estenosis de arteria pulmonar, se ha encontrado una disminución en la densidad de la  $I_{Ca}$  (Bouron y cols., 1992). En hipertrofia ventricular derecha severa (Nuss y Houser, 1991) e izquierda en fase descompensada (Bailey y Houser, 1992), también se indicó una disminución en la  $I_{Ca}$ , sugiriendo que pueda ser el paso de una hipertrofia compensada a una insuficiencia

cardíaca. En un trabajo más reciente (Nuss y Houser, 1993) en células hipertróficas de gato por estenosis aórtica, se ha indicado que aunque la amplitud de la corriente de calcio tipo L no está alterada en la hipertrofia, la densidad está disminuida y la inactivación enlentecida, y además encontraron una expresión de canales de calcio tipo T (normalmente sólo se habían encontrado en fetos y neonatos), que se podría relacionar con la aparición de la actividad eléctrica espontánea y la mayor probabilidad de arritmias observadas en los corazones hipertróficos. También se ha sugerido que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pueda estar alterado en la hipertrofia (Aronson, 1980; Coraboeuf, 1992).

Según los estudios de Gülch y cols. (1979) no parece que esté aumentada la corriente de sodio, puesto que la adición de un bloqueante de sodio no indujo alteraciones en la duración del potencial de acción en células hipertróficas. Sin embargo, más tarde Barrington y cols. (1988) encontraron que los miocitos aislados de corazón de gato con estenosis de la aorta pulmonar, la densidad de la  $I_{\text{Na}}$  estaba aumentada, pero se inactivaba más rápido, por lo que no parece que pueda estar implicada en el incremento en la duración del potencial de acción en las células hipertróficas.

Los corazones hipertróficos tienen mayor probabilidad de sufrir isquemia, debido a las alteraciones en la vasculatura coronaria que presentan. En este sentido, Cameron y cols. (1988), en miocitos hipertróficos por estenosis de la aorta en gato, encontraron una modificación en la cinética de los canales de potasio dependientes de ATP. Estos investigadores observaron que las células hipertróficas mostraban una mayor probabilidad de apertura que las controles ante reducciones en la concentración de ATP de la misma magnitud.

Estudiando la corriente de calcio, Kleiman y Houser (1988) encontraron un aumento aparente de la amplitud de dicha corriente, pero en presencia de  $\text{Cs}^+$ , un bloqueante de  $\text{K}^+$ , la  $I_{\text{Ca}}$  no variaba en los corazones hipertróficos. Puesto que la  $I_{\text{Ca}}$  y la  $I_{\text{to}}$  son de signo opuesto y a ciertos potenciales se pueden contrarrestar, el aparente aumento de  $I_{\text{Ca}}$  podría ser debido a una disminución de la  $I_{\text{to}}$ . También otros autores sugirieron que más que un aumento en la corriente de entrada de calcio, la disminución

de la corriente transitoria de salida sería la responsable de la prolongación de los potenciales de acción en las células hipertróficas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de esta corriente son contradictorios. Unos autores han encontrado, en rata con hipertensión renovascular, que la amplitud de la  $I_{to}$  estaba aumentada y su cinética alterada, aumentando el tiempo de inactivación, pero desplazándose la curva de inactivación en estado estacionario hacia potenciales más negativos (Keung y cols., 1987). En gato, se confirmó que la curva de inactivación estaba desplazada hacia potenciales hiperpolarizados, pero también la activación, y en mayor medida, por lo que la corriente de ventana resultaba aumentada (Zhang y cols., 1991a). Sin embargo, otros autores han encontrado una disminución en la densidad de la corriente  $I_{to}$  (Xu y Best, 1991; Coulombe y cols., 1993).

Respecto a la  $I_K$ , Ten Eik y cols. (1983) indicaron que estaba disminuida, y su activación en estado estacionario desplazada hacia potenciales más positivos, pudiendo ser la causa del incremento en la duración del potencial de acción en los cardiomiocitos hipertróficos. Posteriores estudios han indicado que esta corriente está disminuida en las células hipertróficas, con una activación más lenta y una inactivación más rápida (Kleiman y Houser, 1989), pudiendo explicar así una prolongación del potencial de acción.

Los estudios de la  $I_{K1}$  en corazones hipertróficos han mostrado un aumento en la magnitud de esta corriente (Barrington y cols., 1988; Kleiman y Houser, 1989), lo que no puede explicar el alargamiento en la duración del potencial de acción. Más tarde Zhang y cols., (1991b) encontraron una alteración de su cinética.

Otro factor que no hay que olvidar, es la heterogeneidad de las células ventriculares. Si ya se han encontrado diferencias en situación control, en la hipertrofia estas variaciones se pueden mantener o modificar. Desde el punto de vista macroscópico, se ha observado que la hipertrofia afecta principalmente al septum interventricular (Komajda y Groszogaat, 1990). Anversa y cols. (1978) han demostrado, en un modelo de hipertrofia renovascular en rata, que la hipertrofia afecta más a las células del endocardio que a las del epicardio. Los potenciales de acción resultan más alargados en la trabécula

ventricular que en el músculo papilar (Gülch y cols., 1979), estando retardada toda la repolarización en las células del endocardio y músculo papilar, y sólo la parte final en las células del epicardio (Gülch, 1980; Keung y Aronson, 1981). El hecho de que la hipertrofia induzca cambios electrofisiológicos diferentes en distintas regiones del ventrículo, puede estar relacionado con la mayor susceptibilidad de los corazones hipertróficos a sufrir arritmias.

### **2.3.- RIESGOS ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE HIPERTROFIA CARDÍACA**

En 1948 comenzó el estudio Framingham, un seguimiento de un grupo de hombres y mujeres en los que bienalmente se estudia la aparición de alteraciones cardiovasculares y la mortalidad. Estas personas fueron seleccionadas basándose en distintos factores de riesgo, incluyendo hipertrofia cardíaca. De los datos obtenidos en 36 años de este estudio, se puede afirmar que la hipertrofia ventricular izquierda es un indicador de futura enfermedad aterosclerótica letal (Kannel y Cobb, 1992). En este sentido se ha observado que la incidencia de problemas cardiovasculares que terminan en muerte, incrementa progresivamente con la masa del ventrículo izquierdo. Los mayores riesgos asociados a la hipertrofia son: insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, infarto de miocardio y muerte súbita (Weber, 1988). Con los datos del estudio Framingham de 36 años de seguimiento, se ha estudiado la mortalidad en personas con hipertrofia ventricular izquierda. La mayoría de estas muertes estaban registradas como debidas a "causas diversas" no especificadas, seguidas de las provocadas por insuficiencia cardiovascular, coronaria y muerte súbita. Cuando se comparó con la mortalidad de personas de la misma edad sin hipertrofia cardíaca, se vio que la mortalidad por causas diversas, estaba aumentada casi 4 veces en el grupo de los hipertróficos, y la mortalidad por los procesos cardiovasculares aumentó entre 6 y 9 veces (Kannel y Cobb, 1992). Aunque en general, el riesgo de muerte en las mujeres es menor, en el caso de pacientes con hipertrofia cardíaca no hubo diferencias por sexos en el riesgo de mortalidad, excepto en el caso de las provocadas por muerte súbita, que fue menor en las mujeres. La aparición de hipertrofia, generalmente es el aviso de serias enfermedades cardíacas futuras. A pesar de la falta de síntomas, los datos del estudio Framingham demuestran que una vez presente

la hipertrofia ventricular izquierda, más de un tercio de los hombres y un quinto de las mujeres murieron durante el estudio. Esto, para los hombres supone una mortalidad 7 veces mayor de la normal.

Aunque no todas, la mayoría de las muertes en estos pacientes con hipertrofia cardíaca tuvieron lugar después de manifestarse alguna patología cardiovascular. El mayor riesgo fue para la insuficiencia cardíaca, la cual, después de corregirla por la edad, resultó 13 veces mayor para las mujeres y 15 para los hombres, y la enfermedad coronaria fue el proceso más común y letal. En personas que ya habían sufrido un infarto, la presencia de hipertrofia incrementó el riesgo de volver a sufrir otro infarto, enfermedad coronaria y, en definitiva, aumentó la mortalidad.

También se observó que existe una asociación entre la presencia de hipertrofia ventricular izquierda y la aparición de diferentes arritmias ventriculares, incluyendo algunas graves, lo que puede estar en relación con el mayor riesgo (de 2 a 6 veces) de las personas con hipertrofia, de morir súbitamente.

El riesgo de sufrir enfermedad coronaria en personas con corazones hipertróficos es mayor en pacientes hipertensos, aunque también está aumentado en las normotensas. En ambas existe una relación directa entre el incremento en la masa cardíaca y el riesgo de enfermedad cardiovascular.

### 2.3.1.- INSUFICIENCIA CORONARIA.

En corazones normales, se mantiene el equilibrio entre la demanda de oxígeno y el aporte del mismo. En personas con hipertrofia cardíaca (exceptuando la hipertrofia cardíaca fisiológica, como es el caso de los deportistas), el área transversal de los capilares coronarios no está incrementado en relación al aumento de la masa cardíaca. La distancia entre capilares es mayor en corazones hipertróficos, siendo este hecho más acusado en la región subendocárdica (Bache, 1988; Kayar y Weiss, 1992). Consecuencia de ello es que

las células de estos corazones están peor irrigadas, por lo que tienen mayor riesgo de angina e isquemia, más aún teniendo en cuenta que las células hipertróficas necesitan un consumo mayor de energía.

### 2.3.2.- ARRITMIAS VENTRICULARES.

La hipertrofia ventricular izquierda es, por sí misma, un factor de riesgo de la aparición de arritmias. Mc Lenachan (1987) estudió pacientes hipertensos con y sin hipertrofia cardíaca y encontró que diferentes tipos de arritmias ventriculares estaban asociadas a la presencia de hipertrofia, mientras que los pacientes hipertensos sin hipertrofia no presentaron mayor riesgo de sufrir arritmias que personas normotensas. Esta mayor frecuencia en la aparición de arritmias puede ser grave, puesto que datos del estudio Framingham (Bikkina y cols., 1993) mostraron que en pacientes con hipertrofia, sin aparente enfermedad coronaria, la presencia de arritmias ventriculares asintomáticas estaba asociada con más del doble de riesgo de mortalidad, después de ajustar por otros factores de riesgo.

El mecanismo por el cual los pacientes con hipertrofia ventricular izquierda tienen mayor riesgo de sufrir arritmias y la mayor mortalidad asociada a tales arritmias no es bien conocido. Podría ser debido a distintas alteraciones que se han encontrado en la hipertrofia, como la reducción en la reserva vascular coronaria, isquemia asintomática, propiedades anormales en la membrana del miocito o alteraciones electrofisiológicas. Estas últimas pueden deberse al aumento de tejido fibroso o distinto contenido en colágeno, o bien a alteraciones electrofisiológicas del miocito cardíaco. La hipertrofia severa, incluso en ausencia de insuficiencia cardíaca, se asocia con fibrosis intersticial, y la presencia de áreas de actividad eléctrica deprimida, lo que puede enlentecer la conducción y provocar arritmias por reentrada (Pye y Cobbe, 1992). Además puede inducirse actividad espontánea, puesto que se han observado postpotenciales con bloqueantes de calcio en corazones hipertróficos y no en normales (Pye y Cobbe, 1992).

Estudios epidemiológicos sugieren que los pacientes con hipertrofia ventricular izquierda debida a hipertensión sistémica, tienen riesgo significativamente mayor de muerte súbita a consecuencia de infarto de miocardio (Kannel y cols., 1969 y 1975). Puede ser en parte debido al descenso en la reserva coronaria, pero también a las arritmias ventriculares a las que el corazón hipertrófico está más expuesto. Dado que una arritmia ventricular (fibrilación) es la responsable de la mayoría de los casos de muerte post infarto (Nikolic y cols., 1982), Kohya y cols. (1988) estudiaron la hipótesis de que los corazones hipertróficos eran más susceptibles a fibrilación ventricular durante isquemia. Lo estudiaron en corazones de rata hipertróficos por estenosis de la aorta abdominal, y demostraron que estos corazones eran más susceptibles a sufrir fibrilación ventricular y taquiarritmias durante isquemia que los corazones normales, y además este problema era tanto más frecuente, cuanto mayor era el grado de hipertrofia, alcanzando el 100% en casos severos.

### 2.3.3.- INSUFICIENCIA CARDÍACA CONGESTIVA.

En el corazón hipertrófico, el número de capilares coronarios no incrementa en proporción al aumento de la masa cardíaca, lo que puede sugerir que un mecanismo posible que haga desembocar el corazón hipertrófico en una insuficiencia cardíaca, podría ser un déficit en la energía química disponible para la contracción. Estudios bioquímicos y morfológicos del corazón hipertrófico han encontrado cambios en la composición celular, indicando que estos corazones se encuentran en un estado de pobre reserva energética. En este sentido, se ha observado (en el corazón de rata con hipertrofia inducida por sobrepresión) que el desarrollo de hipertrofia cardíaca está asociado con un incremento en la fracción de volumen celular ocupado por miofibrillas (que consumen energía), mientras que la masa de mitocondrias (que generan ATP) está disminuida en relación a las miofibrillas (Anversa y cols., 1980). Estos dos hechos juntos, la isquemia relativa, y el incremento desproporcionado de las proteínas contráctiles en relación a las mitocondrias, pueden contribuir al déficit de energía en la insuficiencia cardíaca congestiva. Además, el corazón con insuficiencia, consume más oxígeno, y contiene menos fosfatos ricos en energía (Katz, 1988).



La tercera fase en la respuesta de un corazón ante el incremento en la demanda de trabajo hemodinámico (muerte celular con la sustitución de los elementos contráctiles por tejido fibroso), puede ser explicada en parte por una disponibilidad inadecuada de energía, necesaria para mantener los niveles altos de trabajo exigidos al corazón. Además, aunque la contracción necesita energía para la interacción entre las proteínas contráctiles, el calcio necesario para que se produzca esta contracción entra a través de los canales de calcio de la membrana, que se abren en respuesta a una despolarización, y de los canales de calcio activados por calcio. Estos canales se abren, y el calcio entra a favor de gradiente, puesto que la concentración intracelular libre del citosol es muy baja. Sin embargo, para la relajación es necesario que el calcio salga del citosol al exterior de la célula, o entre al interior del retículo sarcoplásmico, mediante una bomba de calcio dependiente de ATP, por lo que la relajación requiere gasto de energía (Katz, 1988). Este es el motivo por el cual los corazones insuficientes (con menor número de mitocondrias en relación al número de miofibrillas) tienen comprometida la relajación.

## 2.4.- TRATAMIENTO

Mientras que el crecimiento del músculo miocárdico parece ser un proceso adaptativo gobernado por la carga a la que está sometido el ventrículo, la proliferación del tejido intersticial en la hipertrofia ventricular izquierda puede causar una reorganización del espacio extracelular que puede ser importante en la hipertrofia patológica. Es este componente el que produce "dureza" ventricular. No está claro donde se terminan los beneficios de la hipertrofia compensada y dónde comienza a ser un proceso patológico. El hecho es que cuando aparece una hipertrofia ventricular, debe ser considerada un signo serio de posibles cardiopatías, más que un proceso compensatorio beneficioso, puesto que los datos del estudio Framingham han revelado que la hipertrofia cardíaca, aún en fase compensada, es un factor independiente de riesgo de sufrir alteraciones cardiovasculares futuras e incrementa mucho la probabilidad de muerte (Kannel y Cobb, 1992). De ahí se deduce la importancia de usar un tratamiento que consiga revertir la hipertrofia. Por ello se está poniendo mucha atención en el efecto del tratamiento antihipertensivo, no sólo en la presión sanguínea, sino también en la hipertrofia cardíaca. Un buen antihipertensivo,

debería ser capaz, además de bajar la presión arterial, conducir a una disminución de la hipertrofia del miocito cardíaco, revirtiendo la fibrosis miocárdica, y mejorando la reserva coronaria.

De hecho, los efectos del tratamiento antihipertensivo en la masa cardíaca varían ampliamente entre distintos grupos. Algunos inducen una regresión total o parcial de la hipertrofia ventricular izquierda (Sen y cols., 1976 y 1980). Por ejemplo, se ha observado una regresión en la hipertrofia usando  $\beta$ -bloqueantes, antagonistas de calcio, inhibidores del enzima de conversión de angiotensina y simpaticolíticos (Motz y cols., 1992; Eagle y cols., 1993). Sin embargo, no todos tienen los mismos efectos beneficiosos. Por ejemplo, se ha visto que los  $\beta$ -bloqueantes no mejoran la función diastólica, mientras que los bloqueantes de calcio sí lo hacen en los corazones hipertróficos en los que estaba disminuida (Betolucchi y Chiarello, 1992). Otros fármacos, como vasodilatadores y diuréticos, que estimulan la actividad adrenoceptora e incrementan los niveles de AT II, son menos efectivos en la reversión de la hipertrofia ventricular izquierda. Puede ser porque el efecto de reducir la presión sistólica, queda contrarrestado por la acción trófica de la AT II y las catecolaminas (Motz y cols., 1992). Otros inducen un incremento en el peso cardíaco aún disminuyendo la presión sanguínea (Frohlich, 1979). La falta de correlación entre los efectos de estos agentes en la presión arterial y la masa cardíaca ha llevado a especular sobre factores difusibles estimulantes del crecimiento cardíaco. Especialmente interesante es la regresión de la hipertrofia que se ha encontrado con los IECA (Eichstaedt y cols., 1989), puesto que el SRA local ha sido implicado en la patogénesis de diversos desórdenes cardiovasculares, incluida la hipertrofia cardíaca. Además, la acción de los IECA puede ser no sólo a nivel sérico, sino que gran parte de su acción podría ser debida a la inhibición de la ECA a nivel tisular.

La regresión de la hipertrofia puede ser decisiva para reducir el consumo de oxígeno, y prevenir a largo plazo las serias complicaciones de la hipertensión. Más aún, teniendo en cuenta que el corazón es el único órgano en el que la perfusión ocurre durante la diástole. Así pues, la presión de la perfusión coronaria coincide con la presión diastólica. La perfusión coronaria queda asegurada en un amplio rango de presiones por

la propia autorregulación que induce vasodilatación cuando la presión diastólica disminuye. En condiciones normales, las arterias coronarias son capaces de dilatarse hasta un volumen cinco veces mayor que en situación basal, teniendo así una reserva de flujo coronario de cinco (Klocke, 1987), sin embargo, la hipertrofia cardíaca disminuye la reserva vasodilatadora (Rembert y cols., 1878; Wangler y cols., 1982; Peters y cols., 1984), por lo que estos pacientes tienen mayor riesgo de sufrir isquemia cuando la presión diastólica está disminuida en exceso. En este sentido, con datos del estudio Framingham, se ha demostrado que en pacientes con hipertrofia ventricular izquierda, cuando se baja la presión diastólica hasta valores alrededor de 70 mm de Hg, se eleva la mortalidad (Cruickshank, 1992). Los inhibidores del enzima de conversión han probado su eficacia en prevenir el descenso en la reserva coronaria provocada por la hipertrofia (Clozel y cols., 1988). Estudios realizados sobre las arterias en hipertensión, han demostrado que existe una alteración en su estructura, lo que puede alterar su función. Una vez que estas anormalidades han aparecido, es difícil conseguir su reversión. Estudios comparativos en ratas espontáneamente hipertensas, utilizando distintos fármacos (hidralazina, antagonistas de calcio, inhibidores del enzima de conversión de angiotensina y  $\beta$ -bloqueantes), encontraron una mejor estructura arterial en aquellas ratas tratadas crónicamente con perindopril (un inhibidor del enzima de conversión) (Mulvany, 1990).

Otro factor a tener en cuenta es el costo económico para la sociedad. Utilizando los datos del estudio Framingham, se evaluó el coste a largo plazo de la terapia antihipertensiva con distintos fármacos capaces de revertir la hipertrofia cardíaca:  $\beta$ -bloqueantes, inhibidores del ECA y antagonistas de calcio (Eagle y cols., 1993). Para evaluar el coste, se tuvo en cuenta tanto el precio de la terapia con cada fármaco, como el seguimiento y la falta de productividad por la aparición de distintas alteraciones cardiovasculares. Según la masa ventricular al inicio del tratamiento los pacientes fueron divididos en bajo, medio y alto riesgo. Los datos indicaron que los tres fármacos estudiados fueron efectivos en disminuir la masa cardíaca en los pacientes de moderado y alto riesgo, aunque en distinta proporción. La mayor reducción se obtuvo con los inhibidores del ECA, seguido de los  $\beta$ -bloqueantes, y los que redujeron en menor extensión la masa ventricular fueron los antagonistas de calcio (20%, 18%, y 5%, en

pacientes de alto riesgo tratados con inhibidores del ECA,  $\beta$ -bloqueantes, y antagonistas del calcio, respectivamente). El coste a largo plazo del tratamiento con inhibidores del ECA y  $\beta$ -bloqueantes fue el más bajo y similar, puesto que el mayor precio de los primeros fue contrarrestado con su mayor efectividad en la reversión de la hipertrofia cardíaca.

#### 2.4.1.- INHIBIDORES DEL ENZIMA DE CONVERSIÓN DE ANGIOTENSINA

##### 2.4.1.1.- *Historia*

Desde que se descubrió el papel del SRA en la hipertensión arterial, se empezaron a buscar inhibidores de ese sistema clínicamente útiles. Se han sintetizado y estudiado antagonistas peptídicos de la AT II pero sólo se cuenta clínicamente con la saralasina (Sar<sup>1</sup> Ala<sup>8</sup> AT II) y su utilización es muy limitada, puesto que al ser de naturaleza peptídica su administración debe ser parenteral, además de exhibir propiedades de agonista parcial. De todas formas, la introducción de análogos peptídicos antagonistas de la AT II, condujo al mayor conocimiento y entendimiento del papel fisiológico y patológico del SRA, en el hombre y en un gran número de animales de laboratorio. Los antagonistas peptídicos de los receptores de AT II fueron abandonados clínicamente cuando en 1977 Ondetti y Cushman descubrieron otra forma de bloquear el SRA, esta vez a nivel del ECA, de forma oral (Johnston, 1993).

En la década de los 60 se observó que los venenos de algunas víboras de América del Sur, *Bothrops jararaca*, no sólo formaban bradiquinina (BK) sino que intensificaban la respuesta a ella. Estos compuestos formaban una familia de péptidos de 3 a 5 aminoácidos que inhibían el enzima que degrada la BK. En 1968, se descubrió que estos mismos factores también inhibían el ECA que produce AT II a partir de AT I. Por lo tanto, este enzima tiene una doble acción: por una parte participa en la destrucción de BK (potente vasodilatador) y por otra produce la formación de AT II (potente vasoconstrictor);

pero parece que los principales efectos de estos venenos son debidos a la inhibición de la síntesis de AT II puesto que este enzima es específico y, sin embargo, otros enzimas pueden degradar la BK.

Siguiendo con estos estudios, se pudo disponer de un nonapéptido (teprotide) que fue probado en el hombre, y demostró ser capaz de producir una disminución de la presión arterial mayor que los antagonistas de AT II hasta entonces conocidos, y de forma más general, siendo también activo en la hipertensión esencial. El teprotide es un inhibidor competitivo del ECA con mayor afinidad que la AT I, pero tiene una corta duración de acción y debe administrarse por vía parenteral ya que es un péptido. Intentando salvar estos inconvenientes, se empezaron a buscar inhibidores no peptídicos del ECA. Se sabía que esta enzima era una metalopeptidasa dependiente de zinc y, basándose en ello, Ondetti y Cushman buscaron un inhibidor que se pudiera unir a este zinc. Por este motivo incorporaron un grupo sulfhidrilo en su molécula original, y así se obtuvo el captopril (Cushman y Ondetti, 1991). Después se han ido sintetizando otros inhibidores del ECA con otros ligandos al zinc como el grupo carboxilo (enalapril), o fosfinilo (fosinopril) (ver fig. 6).

#### 2.4.1.2.- *Clasificación*

Los fármacos inhibidores del ECA (IECA) se pueden agrupar según sus diferencias estructurales, en los grupos presentados en la tabla 3. Los fármacos están clasificados según la naturaleza del grupo químico que se une al zinc del ECA (fig. 6). De ésta forma, existen IECA's con grupo sulfhidrilo, que son derivados del captopril; con grupo carboxilo, como el enalapril; o con grupo fosfínico como el fosinopril (Johnston, 1993). Últimamente se ha encontrado otro IECA, el idrapril, en el cual el grupo que se une al zinc del ECA es un hidroxámico (Subissi y cols., 1992).

**Tabla 3:** Clasificación de los inhibidores del enzima de conversión de angiotensina según la naturaleza química del grupo que se une el zinc del enzima.

CON GRUPO (SH)	CARBOXIALQUILDIPÉPTIDOS	CON GRUPO (PO <sub>2</sub> )
Captopril	Enalapril	Fosinopril
Pivalopril	Ramipril	Ceranapril
Rentiapril	Quinapril	SQ 29.852
Zofenopril	Pentopril	
Alacepril	Perindopril	
MC 838	Cilazapril	
Fentiapril	Delapril	
	Lisinopril	
	Benazepril	
	Espirapril	
	Trandolapril	
	Moexipril	
	Temocapril	

Modificada de Unger y Gohlke, 1994.

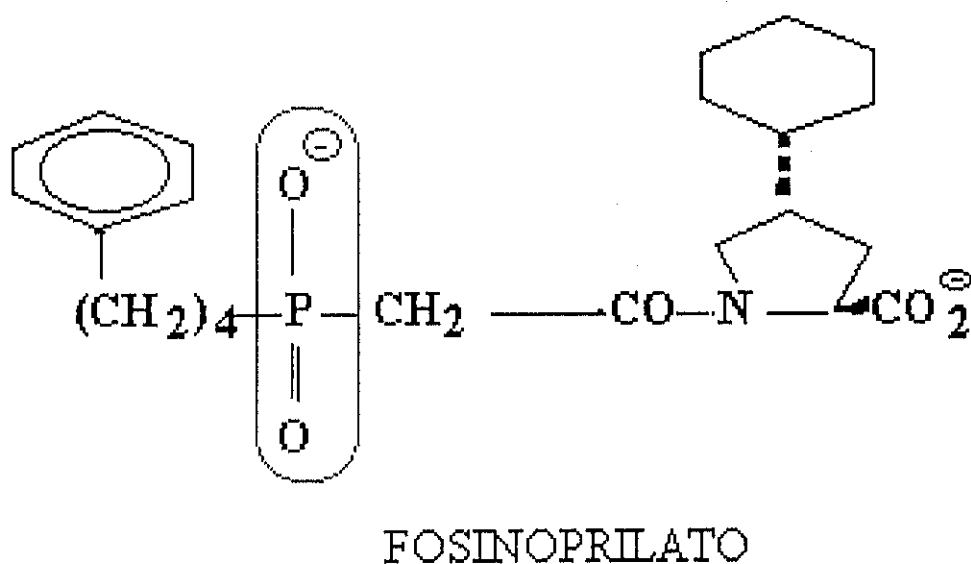
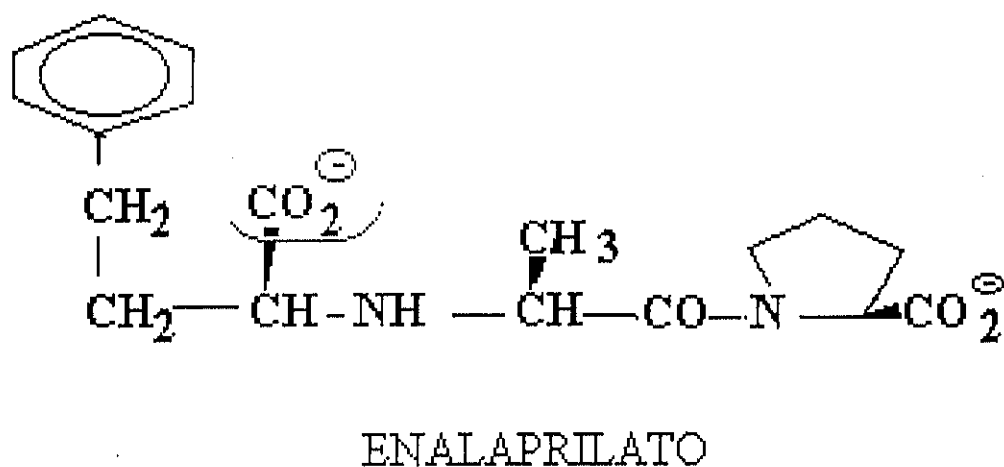
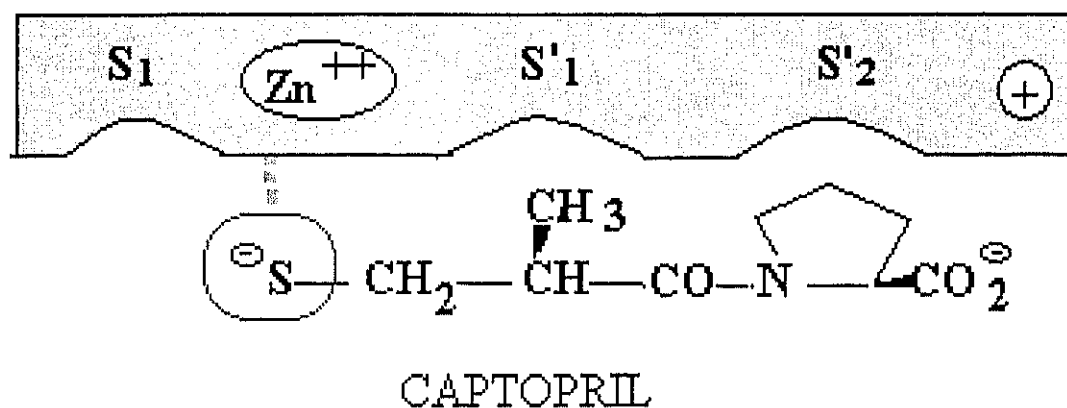


Fig. 6: Esquema representando la unión con el ECA de un representante de cada grupo de IEC.

### 2.4.1.3.- *Farmacocinética*

El captopril es un activo IECA, pero su absorción en el tracto gastrointestinal no es muy alta, y puede ser reducida con la presencia de alimentos. La mayoría de los nuevos compuestos, a excepción del lisinopril y ceranopril, son profármacos, normalmente por la adición de un grupo ester que hace los compuestos más lipofílicos, mejorando la absorción gastrointestinal e incrementando su biodisponibilidad. Para ser activos requieren la ruptura del grupo ester para liberar la sustancia activa.

Hay que recordar que el ECA tiene una amplia distribución en el organismo, siendo localizado en muchos tejidos, incluyendo el cardíaco, además de en el plasma. De esta forma, este enzima se une a muchos ligandos, no sólo a la AT I y a la bradiquinina, sino que también es capaz de hidrolizar encefalinas y neurotensina, además, se ha visto *in vitro* que es capaz de degradar la sustancia P y la hormona luteneizante. Los IEC inhiben el ECA tisular en la misma medida que la plasmática (Johnston y cols., 1988). El grado de inhibición en cada tejido depende de distintos factores, entre los que se encuentran la concentración plasmática, la solubilidad lipídica, la penetración en el tejido en cuestión, la existencia de sistemas de transporte, la capacidad del tejido de desesterificar el profármaco, en el caso de que el IECA que nos interese sea un precursor de la sustancia activa, y la existencia de barreras naturales como la hematoencefálica. Por estos motivos es teóricamente posible el desarrollo de compuestos que tengan acceso limitado a ciertos tejidos.

El captopril no es un profármaco y no requiere desesterificación para liberar la sustancia activa. Su absorción oral es del 75 % (Murdoch y McTavish, 1992) y resulta disminuida por la presencia de alimento. Los que son profármacos requieren una biotransformación que ocurre en su mayor parte en el tracto gastrointestinal y en el hígado. Sin embargo, otros tejidos contienen esterasas. La distribución y biodisponibilidad dependen también de la propiedad lipofílica de cada compuesto. Muchos IECA se unen a las proteínas plasmáticas, el captopril lo hace en aproximadamente un 30 %. Este fármaco, y otros con grupo sulfhidrilo, sufren transformaciones complejas en el organismo, en parte



porque el grupo SH se une a la cisteína y otros compuestos, actuando como un antioxidante o antirradicales libres. Ésto complica su farmacocinética, puesto que el captopril se convierte mediante reacciones reversibles en unos compuestos inactivos que pueden volver a liberar la sustancia activa, actuando como una forma de depósito (Drummer y Jarrott, 1986). La principal ruta de eliminación del captopril es la excreción renal, sin embargo otros IECA, como el perindopril, son metabolizados a sustancias inactivas.

#### 2.4.1.4.- *Efectos cardioprotectores*

El primer y principal efecto de los IECAs es la reducción en la presión arterial, que se manifiesta no sólo en casos de hipertensión renovascular donde el SRA está potenciado, sino también en hipertensión esencial, especialmente en pacientes ancianos, en los cuales el SRA está disminuido (Hanson y cols., 1993). Pero la meta en la terapia antihipertensiva no es solamente reducir la presión sanguínea, sino también reducir los riesgos asociados a esa hipertensión. Por lo tanto, aunque el control de la presión sanguínea es deseado, no es el final del tratamiento antihipertensivo, ya que aunque se normalice la presión, la morbilidad y mortalidad de estos pacientes continúa siendo más elevada que los normotensos. En este sentido hay que indicar, que la vía para disminuir las alteraciones cardiovasculares y la mortalidad, es la prevención (y la reversión) de los daños ocasionados en el corazón y los vasos sanguíneos, entre otros órganos. En este Aaspecto, los IECA han demostrado un efecto cardioprotector, siendo capaces, además de normalizar la presión sanguínea, de mejorar el flujo coronario aliviando la respuesta del corazón a la isquemia, de disminuir el tamaño de infarto y prevenir el reinfarto, de prevenir o revertir la hipertrofia, de ser eficaces en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, y en definitiva, disminuir la mortalidad.

En un estudio realizado en ratas con infarto, se analizó el efecto hipotensor del captopril, observándose que además de bajar la presión sistólica y la presión media arterial, disminuyó la presión media de llenado y la complianza venosa, el volumen sanguíneo y el volumen ventricular izquierdo al final de la diástole. Esto indicó que el

captopril, además de ser un vasodilatador arterial, es un venodilatador, siendo capaz de disminuir el volumen sanguíneo (Raya y cols., 1989). En condiciones normales, el flujo coronario se autorregula en un amplio margen de presiones, para mantener constante el aporte de oxígeno y nutrientes a las células cardíacas. Sin embargo, en condiciones como la hipertensión y la hipertrofia cardíaca, el comportamiento de la vasculatura coronaria puede variar. En este aspecto, el tratamiento con cilazapril ha demostrado que el descenso en la presión sanguínea se acompaña de un incremento en el flujo coronario, en contra de un descenso como cabría esperar de una menor presión de perfusión. Este incremento en el flujo coronario provocado por cilazapril no se acompaña de un incremento en las demandas de oxígeno, puesto que el descenso sostenido de la presión arterial no se acompañó de incremento en la frecuencia, ni en la diferencia de oxígeno entre la sangre arterial y la venosa (Magrini y cols., 1992). Esta observación implica que el mecanismo responsable del incremento en el flujo coronario es una menor resistencia coronaria inducida por el tratamiento con este fármaco (Clozel y Hefti, 1988).

Otro efecto beneficioso, observado en el tratamiento con IECA, es la mejora de la función contráctil. En corazones infartados de ratas, una alteración que aparece, entre otras, es el incremento en el tiempo que se tarda en alcanzar el pico de máxima tensión, y el tratamiento de estos animales con captopril lo normalizó (Litwin, y cols., 1991). En situación de isquemia-reperfusión, el zofenopril y el enalapril mejoraron la contractilidad de los corazones de perro (Przylenk y Kloner, 1991). En estas situaciones, frecuentemente aparecen arritmias en el período de reperfusión. Pues bien, los IECA han probado que son capaces de reducir la incidencia y duración de estas arritmias (Linz y cols., 1989b; Schölkens y Linz, 1990; Arad y cols., 1992).

### *Efectos en la hipertrofia*

Aunque la hipertrofia ventricular izquierda es el principal mecanismo de adaptación del corazón a una sobrecarga hemodinámica crónica, cada vez se está dando más importancia a la hipertrofia, como un factor de riesgo independiente para el posterior desarrollo de complicaciones cardiovasculares. Los resultados del estudio Framingham

(Kannel y cols., 1969) sugirieron una interrelación importante entre presión arterial, hipertrofia ventricular izquierda y el riesgo de insuficiencia cardíaca. La hipertrofia se correlaciona con la aparición de insuficiencia cardíaca sintomática, mayor incidencia de fallos coronarios, arritmias ventriculares y muerte súbita. Por estos motivos, es de gran interés clínico el estudio de sustancias que interfieran en el desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda. La reversión de la hipertrofia puede ser decisiva para reducir el consumo miocárdico de oxígeno, y prevenir las serias complicaciones asociadas a la hipertrofia cardíaca a largo plazo.

Respecto a la hipertrofia inducida por sobrepresión, pacientes hipertensos que habían desarrollado hipertrofia ventricular izquierda, fueron tratados con ramipril durante tres meses, y después de este tiempo se observó que la hipertrofia se había revertido en parte, acompañándose de un descenso en el contenido de RNA en las fibras cardíacas, pero el incremento en los componentes intersticiales, tales como el colágeno, una vez instaurado pareció irreversible (Eichstaedt y cols., 1989). En ratas espontáneamente hipertensas, el tratamiento con cilazapril (Clozel y Hefti, 1988) o captopril (Pfeffer y cols., 1982) previno la aparición de hipertrofia cardíaca, normalizando la eyección sanguínea del corazón, y disminuyendo la resistencia vascular coronaria. En ratas con oclusión parcial de la aorta abdominal, el tratamiento con ramipril fue capaz de prevenir el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y revertirla una vez instaurada, mientras que dosis que producían la misma disminución en la presión arterial de nifedipina y dihidralazina fallaron. Especialmente interesante es el hallazgo de que una dosis de ramipril no hipotensora, fue capaz de revertir la hipertrofia cardíaca (Linz y cols., 1989a), lo cual excluye el efecto hemodinámico y sugiere que una inhibición del ECA a nivel local cardíaco puede ser el responsable de la acción de los IECA en la hipertrofia cardíaca.

La hipertrofia inducida por sobrecarga de volumen también resultó afectada por los IECA. Los corazones de ratas a las que se les había lesionado la válvula aórtica desarrollaron una hipertrofia excéntrica. Se dividieron en dos grupos, uno de los cuales recibió espirapril y el otro no. El grupo control siguió incrementando el peso cardíaco, mientras que el tratado con el IECA se estabilizó (Umemura y cols., 1992). En la

hipertrofia inducida en la parte sana del músculo cardíaco, después de un infarto de miocardio en rata, el tratamiento con captopril durante tres semanas mejoró la contracción y disminuyó el tamaño de los miocitos, aunque el contenido en colágeno siguió elevado (Litwin y cols., 1991). Sin embargo, cuando el tratamiento (con trandolapril en este caso) se prolongó hasta un año, no sólo limitó la hipertrofia cardíaca, sino que también disminuyó el tamaño del infarto y redujo la fibrosis miocárdica y aórtica, a la vez que disminuyó la mortalidad (Richer y cols., 1992). También el enalapril y el perindopril han demostrado su eficacia en la prevención de este tipo de hipertrofia (Hodsman y cols., 1988; Thollon y cols., 1989). En conclusión, el tratamiento con IECA después de un infarto de miocardio puede prevenir las complicaciones a corto plazo (previniendo las arritmias asociadas a la reperusión del área infartada) y a largo plazo (limitando la hipertrofia cardíaca y aumentando la supervivencia) (Vaughan y Pfeffer, 1994), aunque parece ser que el tratamiento con los IECA es beneficioso sólo si se comienza el tratamiento después de cierto tiempo tras el infarto (Hall y cols., 1994).

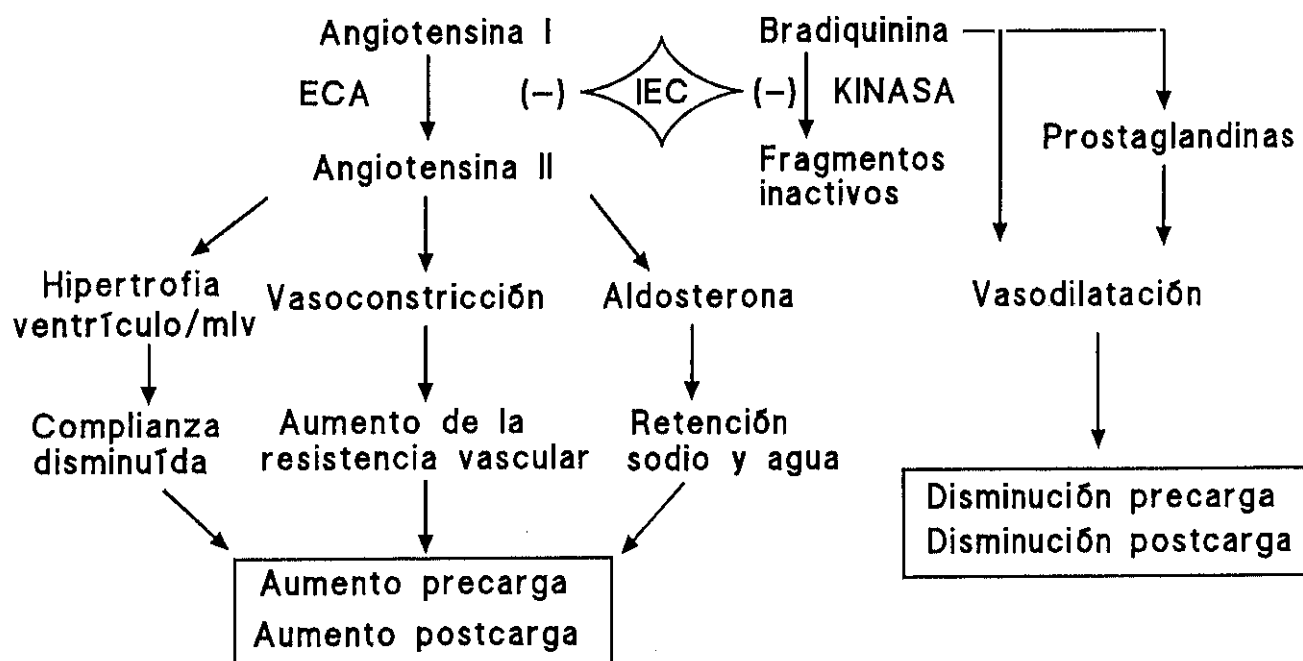
La hipertrofia puede desencadenar una insuficiencia cardíaca. El tratamiento crónico con enalapril, en pacientes con insuficiencia cardíaca leve o moderada causada por enfermedad coronaria o dilatación, previno o revirtió la progresión de la disfunción contráctil, mejorando también la relajación e impidiendo que continuara la dilatación ventricular (Konstam y cols., 1992), y aumentando la tolerancia al ejercicio (Enalapril congestive heart failure investigators, 1987). En pacientes con insuficiencia cardíaca severa, se estudió el efecto del enalapril, además de continuar el tratamiento convencional para la insuficiencia cardíaca, incluyendo vasodilatadores. Los efectos beneficios del tratamiento con este IECA, se reflejaron en la menor necesidad del uso de los otros fármacos y en una disminución del tamaño del corazón. Pero el efecto más importante fue el descenso en la mortalidad por progreso de la insuficiencia cardíaca. A los seis meses del tratamiento, la mortalidad se redujo en un 40%, y al año, en un 31%, en comparación con el grupo de personas que recibieron placebo. El estudio fue suspendido puesto que no se consideró ético continuar dando placebo, conociendo el descenso en la mortalidad en el grupo tratado con enalapril. La reducción en la mortalidad encontrada, se ha asociado a la reducción en las muertes provocadas por la progresión de la insuficiencia cardíaca

(reducción del 50 %), mientras que no se observó ninguna variación en la incidencia de muerte súbita (The Consensus trial study group, 1987).

#### 2.4.1.5.- *Mecanismo de acción*

A pesar de que los IEC se están utilizando clínicamente desde hace 10 años, el mecanismo de acción no está del todo claro. Se ha aceptado generalmente que el mecanismo por el cual reducen la presión de forma aguda, es por una caída en los niveles de AT II circulante. Sin embargo, los efectos hipotensores a largo plazo no se relacionan directamente con los niveles de AT II en plasma. Parece que el efecto de estos fármacos es complejo, y está relacionado con la capacidad de inhibir el ECA a nivel tisular. La dificultad para definir los mecanismos de acción, viene determinada por el hecho de que el ECA tiene varios substratos y que la AT II tiene varias acciones. De esta forma los IECA pueden interaccionar con el sistema de quinina-kalicleína, sistema nervioso simpático, prostaglandinas y factor natriurético auricular (fig 7). Además, en la terapia crónica con IECA se puede inducir la formación del ECA. Unido a lo anterior, la farmacocinética de estos compuestos es compleja por su diferente unión a diferentes tejidos, y la inhibición del ECA tisular. Por ejemplo, mientras el captopril y el enalapril cruzan la barrera hematoencefálica e inhiben el ECA cerebral, el quinapril, incluso en tratamiento crónico es incapaz de inhibir el enzima a este nivel. Como tienen similar efecto en la presión arterial, se deduce que la inhibición central del ECA no es esencial para la acción hipotensora de los IECA (Johnston, 1993).

Se ha sugerido que el efecto en la inhibición del desarrollo de la hipertrofia cardíaca puede estar mediado por la inhibición del ECA no sólo a nivel periférico, sino a nivel local, en el músculo cardíaco (Johnston, 1991; Nelissen-Vrancken y cols., 1992). De hecho, Linz y cols. (1989a) demostraron la prevención y reversión de la hipertrofia cardíaca con ramipril, y no con dosis equivalentes (en cuanto a la disminución de la presión arterial) de nifedipina y dihidralazina. El efecto del IEC en la hipertrofia fue manifiesto incluso a dosis capaces de bloquear el ECA pero sin acción en la presión arterial, por lo que demostraron que el ramipril inhibía la hipertrofia por otro mecanismo aparte del hemodinámico.



**Fig. 7:** Esquema representativo de la interacción de los IEC en el SRA y en el de las quininas (modificado de Ferrario, 1990).

Es posible que alguna de las acciones de los IECA esté mediada por su capacidad de inhibir el enzima encargado de la degradación de la bradiquinina (fig 7). Algunos trabajos realizados en corazón aislado, parecen apoyar esta teoría. En corazones aislados de rata, la perfusión con AT I o AT II agravó las arritmias provocadas por isquemia-reperfusión, mientras que el tratamiento previo con ramipril, o la perfusión con ramiprilato, protegió de ellas. El mismo efecto protector se observó cuando estos corazones fueron perfundidos con bradiquinina. Más aún, la perfusión con un antagonista de bradiquinina abolió los efectos beneficiosos no sólo de la bradiquinina, sino también del ramipril y ramiprilato (Linz y cols., 1989b; Schölkens y Linz, 1990). Estos datos sugieren que al menos los efectos protectores contra las arritmias provocadas por isquemia-reperfusión están mediados por la potenciación de la bradiquinina, además de la inhibición de la formación de AT II a nivel local.

Respecto a la interacción de los IECA con el sistema nervioso simpático, puede estar mediada por el hecho de bloquear la producción de AT II, la cual induce la liberación de noradrenalina al actuar presinápticamente en las terminaciones nerviosas simpáticas (Saxena, 1992). Estudios realizados en ratas tratadas con enalapril (Grichois y cols., 1992), y captopril (Tabrizchi y Triggle, 1992), parecen indicar que el tratamiento crónico con estos fármacos disminuye el tono simpático. Otro factor que induce a pensar que existe una interacción entre los IECA y el sistema nervioso periférico, es el efecto presentado por estos fármacos incrementando el flujo coronario. Es cierto que este hecho podría estar en función de la disminución en el nivel de AT II, y el aumento de bradiquinina que se consigue con los fármacos de este grupo, pero también es cierto que el captopril reduce la vasoconstricción coronaria simpática e incrementa la bradicardia parasimpática (Van Gilst, y cols., 1992). Por lo cual, un posible mecanismo de acción de los IECA, que no debe ser descartado, viene determinado por su interacción en el sistema nervioso simpático y parasimpático.

Los niveles circulantes de prostaglandina  $E_2$  y 6-keto-prostaglandina  $F_{1\alpha}$  incrementaron en el tratamiento con captopril, y la indometacina bloqueó la respuesta hemodinámica a los IECA en pacientes con insuficiencia cardíaca severa (Nishimura y

cols., 1989). Aquí parece haber una diferencia entre los IECA con grupo sulfhidrilo y los que carecen de él. Un estudio hecho en perro, encontró que tanto el zofenopril (con grupo SH), como el enalaprilato (sin grupo SH), como el epicaptopril (un estereoisómero del captopril con grupo SH, pero sin actividad IECA) mejoraban la contractilidad en los corazones de perros sometidos a isquemia-reperfusión (Przylenk y Kloner, 1991). Esta acción fue revertida por la indometacina en el caso del enalapril, pero no en el caso del zofenopril ni del estereoisómero del captopril, lo cual parece indicar que aunque la acción de los IECA en la mejora de la función contráctil en casos de isquemia puede estar mediada por la potenciación de las prostaglandinas, los fármacos que tienen grupo SH tienen otro mecanismo de acción distinto en la cardioprotección, que podría ser su capacidad antioxidante o antirradicales libres (Przylenk y cols., 1991). Los dos ejemplos que acabamos de dar, están, en parte, en contradicción. Por una parte unos investigadores demuestran que el efecto de captopril está mediado por prostaglandinas y por otra parte, otros dicen que los fármacos con grupo sulfhidrilo tienen un mecanismo distinto de acción. Debemos notar, que las situaciones de los dos experimentos son distintas ya que en el primero se trata de insuficiencia cardíaca y en el otro de isquemia. En este sentido, Arad y cols. (1992) encontraron que la producción de prostaglandinas vasodilatadoras estaba incrementada en el corazón de rata con captopril en situación de normoxia, pero no así en isquemia. Esto nos hace pensar en la propiedad antioxidante y antirradicales libres de los IECA con grupo SH en algunos efectos encontrados.

Por tanto, un mecanismo de acción posible para los IECA con grupo sulfhidrilo, es su capacidad antirradicales libres y antioxidante. Recientemente se ha mostrado que en casos de isquemia-reperfusión se generan grandes cantidades de radicales libres (Zweier y cols., 1987), este hecho podría ser el responsable de los efectos adversos asociados a isquemia-reperfusión, incluyendo las arritmias. Esta hipótesis se basa en la observación de que estas arritmias pueden ser reducidas por la acción de sustancias antirradicales libres (Woodward y Zakaria, 1985) y en que la exposición del corazón a radicales libres exógenos induce arritmias (Hearse y cols., 1989), parece ser que por aumentar la duración en el potencial de acción, disminuyendo la  $I_{Ca}$  y la  $I_K$  y aumentando la concentración intracelular de calcio (Cerbai y cols., 1991). Se ha probado para distintos IECA con grupo



sulfhidrilo (entre ellos el captopril) y para el epicaptopril (molécula que posee grupo SH pero carece de actividad IECA) que son capaces de actuar contra los radicales libres. Además, este efecto del captopril se incrementa a pH ácido, lo que podría sugerir una acción cardioprotectora en casos de isquemia (Chopra y cols., 1992). La acción antioxidante, puede estar mediada por la capacidad reductora del grupo SH.

Por otro lado, los fármacos con grupo sulfhidrilo pueden formar complejos con el óxido nítrico contribuyendo a los efectos beneficiosos de estos fármacos. El óxido nítrico, principal factor relajante derivado del endotelio, juega un papel importante en la función miocárdica y en el control del tono vascular, a la vez que actúa como un potente agente antiagregante y antiproliferativo. Los radicales libres derivados del oxígeno, interaccionan con el óxido nítrico destruyendo su bioactividad, mientras que las sustancias como el captopril, interaccionan con él formando S-nitrosocaptopril, que posee potentes propiedades vasodilatadoras. Así pues, es posible que algunas propiedades de los IECA con grupo sulfhidrilo se deban a la protección, o potenciación, de los mecanismos mediados por el óxido nítrico (Bennett y Gardiner, 1993). Pero también es posible que la capacidad de potenciar los nitratos sea un efecto mediado por la bradiquinina, en cuyo caso sería inherente a la inhibición del ECA. Esto se basa en el hecho de que se ha demostrado esta propiedad en fármacos IECA sin grupo sulfhidrilo (Gavras, 1994).

Distintos investigadores han mostrado que los IECA son capaces de prevenir arritmias causadas por isquemia-reperfusión. Este efecto cardioprotector, al menos en el caso del captopril, podría depender del grupo sulfhidrilo, con su acción antirradicales libres. Sin embargo, también se ha encontrado una reducción en las arritmias por isquemia-reperfusión, con otros fármacos IEC sin este grupo (Linz y cols., 1989b), lo que sugiere que todos los IEC, como tales, podrían tener efectos cardioprotectores. Puesto que los IEC son capaces de prevenir arritmias, sería posible que tuvieran alguna acción directa sobre las propiedades electrofisiológicas de las células cardíacas. En este sentido, Bryant y cols. (1991) han encontrado una disminución en la magnitud de la  $I_{Ca}$ , provocada por el captopril en células ventriculares de cobayo. Por otro lado, Enous y cols. (1992), también en células de cobayo, han demostrado una reducción en una corriente arritmogénica

(corriente transitoria de entrada de calcio,  $I_{tl}$ ) con altas concentraciones de perindopril, pero no han encontrado ningún efecto sobre la  $I_{Ca}$ . Tampoco Tabrizchi y Triggle (1992) han encontrado un efecto del captopril sobre la  $I_{Ca}$  en rata. Por lo tanto, hasta la fecha se conoce poco sobre los posibles efectos de los IECA sobre las propiedades electrofisiológicas de las células cardíacas. Respecto a la mejora de la contracción, se ha visto que ratas con insuficiencia cardíaca a consecuencia de un infarto, el manejo de calcio intracelular está alterado, y un tratamiento crónico con captopril, comenzando una semana después del infarto la normalizó (Litwin y Morgan, 1992).

El efecto cardioprotector también podría estar mediado por las alteraciones metabólicas que los IECA son capaces de inducir. Corazones aislados perfundidos con AT I o AT II, incrementaron la liberación en el efluente de las enzimas lactato deshidrogenasa y creatínquinasa, y disminuyeron el contenido de ATP, creatín-fosfato y glucógeno en el miocardio. Lo mismo ocurrió en corazones en situación de isquemia-reperfusión. El pretratamiento con ramipril o la perfusión simultánea con ramiprilato, redujo las actividades enzimáticas en el efluente y elevó los fosfatos ricos en energía y el glucógeno en el corazón. Lo mismo se observó con enalapril, pero no con captopril, a dosis de 50 mg/Kg (Shölkens y Linz, 1990). La perfusión de los corazones isquémicos con bradiquinina, también mejoró los parámetros metabólicos. Los mismos investigadores (Linz y cols., 1989) demostraron que los corazones hipertróficos tienen disminuido el contenido de ATP y creatín-fosfato, y el tratamiento con ramipril, incluso a dosis que no afectan la presión arterial, normalizan estos parámetros. Esta acción de los IECA en el metabolismo cardíaco podría estar relacionada con el efecto cardioprotector de estos fármacos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

#### 2.4.1.6.- *Efectos secundarios*

Para entender mejor los efectos secundarios observados tras la administración de IECA, podríamos dividirlos en varios grupos: Efectos indeseables relacionados con el principal efecto farmacológico de este grupo de fármacos, con otros efectos farmacológicos subsidiarios, con la distinta susceptibilidad individual de cada paciente, o con características especiales de cada compuesto (Fletcher y Dollery, 1993) .

Los efectos secundarios derivados del principal efecto farmacológico dependen de la dosis e incluyen hipotensión e insuficiencia renal en pacientes cuya presión sanguínea es dependiente de la AT II (Groel y cols, 1983). Estos efectos son más evidentes en personas con insuficiencia cardíaca severa que toman dosis altas de diuréticos o glucósidos cardiotónicos. La hipotensión aparece principalmente al inicio del tratamiento con dosis altas de estos fármacos, siendo más acusada en pacientes que reciben diuréticos, y especialmente los que sufren hiponatremia. El motivo de esta hipotensión puede ser la supresión súbita del efecto directo vasoconstrictor de la AT II, junto con el cese del efecto de este péptido como estimulante de la actividad simpática e inhibitoria vagal (Fletcher y Dollery, 1993). Las alteraciones renales que pueden aparecer como consecuencia del tratamiento con los IECA, pueden deberse a la liberación del efecto vasoconstrictor de la AT II en las arteriolas eferentes, lo que resulta en una bajada en la presión intraglomerular (Fletcher y Dollery, 1993). Como consecuencia de la reducción en la liberación de aldosterona por estar disminuidos los niveles de AT II, se puede provocar hiperkalemia (Di Bianco, 1986). Por otro lado, se ha observado la aparición de anomalías en el feto, por lo que no se recomienda el tratamiento con captopril en mujeres embarazadas (Unger y Gohlke, 1994).

Asociado al tratamiento con IECA, se pueden presentar alteraciones cutáneas que consisten en un enrojecimiento de la parte superior de cuerpo, a veces acompañado de prurito (Groel y cols., 1983) o angioedema (Edwards, y Padfield, 1985). Este último es más grave, y puede ser fatal, obstruyendo las vías respiratorias superiores cuando afecta a labios, lengua, laringe o glotis. El mecanismo que se ha sugerido para explicar la aparición de angioedema está mediado por la potenciación de las acciones de la bradiquinina, lo cual puede activar el sistema quinina-kalitreína en individuos susceptibles por presentar una deficiencia hereditaria en el inhibidor de kalitreína, aunque esta hipótesis no se ha probado (Fletcher y Dollery, 1993).

La tos seca aparece esporádicamente en pacientes tratados con IECA, la cual desaparece tras la supresión del tratamiento. La aparición de tos puede estar relacionada con una predisposición genética en ciertos individuos (Fletcher y Dollery, 1993).

Se ha descrito una alteración del gusto o del olfato en los primeros días de la terapia con captopril o enalapril (Fletcher y Dollery, 1993). Este efecto puede estar relacionado con la capacidad de unión al zinc del grupo sulfhidrilo del captopril. También se ha sugerido que este grupo químico puede provocar neutropenia, aunque Di Bianco (1986) negó que en pacientes sin complicaciones de hipertensión, la incidencia de neutropenia fuera mayor con captopril que con otros IECA sin grupo sulfhidrilo. Un efecto secundario raro, pero que puede aparecer en el tratamiento con captopril es la neuropatía, lo cual está asociado a valores elevados en las proteínas del líquido cerebrospinal (Atkinson y cols., 1980).

En algunos casos se ha descrito dolor de cabeza y diarrea asociado al tratamiento con IECA (Fletcher y Dollery, 1993).

#### *2.4.1.7.- Interacciones*

Algunos efectos indeseables de los IECA pueden aparecer como consecuencia de la potenciación de los efectos secundarios de este grupo de fármacos con otros compuestos. Por ejemplo, si se asocia el tratamiento con IECA y diuréticos ahorradores de potasio, o suplementos con este ión, puede aparecer hiperkalemia con bastante probabilidad. El uso concomitante de IECA con antiinflamatorios no esteroideos, puede reducir el efecto antihipertensivo de los inhibidores y provocar nefrotoxicidad. La disminución del efecto de los IECA puede ser también atenuado por la administración conjunta con otros antihipertensivos (Fletcher y Dollery, 1993). El captopril puede disminuir la excreción de la digoxina (Cleland y cols., 1986).

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---

### 3.1.- MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA CARDÍACA

La hipertrofia ventricular izquierda fue inducida por estenosis de la aorta abdominal, según la técnica descrita por Cutilleta y cols. (1975). Ratas macho jóvenes de la raza Sprague-Dawley, de pesos comprendidos entre 180 y 200 g, fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). El abdomen fue desinfectado con alcohol etílico de 96° y abierto por la línea alba. El intestino fue retirado, para permitir el acceso a la aorta abdominal, y envuelto en una gasa empapada en suero salino para evitar la desecación. La aorta abdominal se limpió de tejido conectivo y se colocó en ella un clip de plata de 0.3 mm de apertura, justo antes de la bifurcación de las arterias renales. Este método provoca una sobrepresión que va aumentando progresivamente a medida que el animal va creciendo. Se puso en la cavidad abdominal antibiótico (amoxicilina, 50 mg/Kg), el intestino se colocó en su sitio, y se cerró el abdomen, y la piel, con sutura continua. La herida fue impregnada con tintura de yodo. Durante los cuatro días posteriores a la operación se administró amoxicilina (30 mg/Kg) en el agua de bebida, para evitar infecciones.

Cada animal fue pareado con otro de la misma edad y peso, que sufrió la misma operación y tratamiento, con la única diferencia de que no se colocó ningún clip. Este grupo de animales fue utilizado como control, puesto que anteriores trabajos han demostrado que no existe ninguna diferencia entre animales a los que se les ha realizado la operación simulada, y los no operados (Aronson & Nordin, 1984).

Los animales fueron alimentados *ad libitum* hasta 6 ó 7 semanas después de la intervención, tiempo al cual fueron sacrificados para la realización de los experimentos. Llegado este tiempo, se les administró 400 UI/kg de heparina por vía intraperitoneal y se les decapitó. Los corazones fueron extraídos para la obtención de los miocitos aislados.

Para evaluar la hipertrofia utilizamos el cociente resultante de dividir el peso en mg del corazón entre el peso total del animal en g. Sólo consideramos como hipertróficos aquellos corazones en los que este ratio fue igual o superior al 30% comparando con los controles (Scamps y cols., 1990).

### 3.2.- TÉCNICA DE DISOCIACIÓN DE MIOCITOS CARDÍACOS

La disociación de las células cardíacas se realizó según un método derivado del descrito por Powell y cols (1980). Una vez que los corazones fueron extraídos, se pesaron, y rápidamente se colocaron en un aparato de Langendorff, para la perfusión retrógrada a través de la aorta, por la que se hicieron pasar las siguientes soluciones, oxigenadas y a 35 - 36°C:

1.- Solución de Tyrode normal durante 2-3 min, hasta que el corazón se lavó de sangre y el latido se normalizó. Esta solución contenía, en mM: NaCl, 140; KCl, 5.4;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.4;  $\text{NaHCO}_3$ , 5.8;  $\text{MgCl}_2$ , 1;  $\text{CaCl}_2$ , 1.8; glucosa, 22; Hepes, 5; el pH se ajustó a 7.4 con NaOH.

2.- Solución de Tyrode nominalmente libre de calcio durante aproximadamente 2 min (hasta que el corazón dejó de latir). La composición de esta solución fue igual a la anterior excepto en que no se añadió  $\text{CaCl}_2$ .

3.- Solución de collagenasa Worthington tipo II (60 UI/ml). El enzima se disolvió en la solución de Tyrode sin calcio y se pasó durante un tiempo proporcional al peso del corazón: 13.5 min/g para los corazones normales y 16.5 min/g para los hipertróficos.

4.- Solución de KB (Kraftbrühe) modificada durante 3 min para lavar el corazón de enzima. Su composición fue la siguiente en mM: KCl, 30;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10;  $\text{MgCl}_2$ , 0.5; taurina, 15; glucosa, 11; EGTA, 0.5; ácido glutámico, 70;  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 5; el pH se ajustó con KOH a 7.3.

El flujo fue fijado con una bomba peristáltica (Gilson minipuls 3) a 10 ml/min, excepto cuando se perfundió con collagenasa, que fue a 8 ml/min.

A continuación, se diseccionaron los ventrículos y se seleccionaron tres partes anatómicas: el apex, el septum interventricular y la pared libre izquierda. Puesto que la hipertrofia objeto de estudio, es ventricular izquierda, la pared libre derecha fue desechada.

En cada porción se disgregaron las células con ayuda de unas tijeras (en KB), después de lo cual se filtró, a través de una malla de nylon de 250  $\mu\text{m}$ , para separar los miocitos aislados de trozos de tejido. La suspensión de células se centrifugó a 20 g durante 4 min. Se quitó el sobrenadante, y las células se redispersaron en una solución de almacenamiento que contenía en mM: NaCl, 117; KCl 5.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 4.4;  $\text{MgCl}_2$ , 1.7;  $\text{CaCl}_2$  0.25; glucosa, 11; Hepes, 21; creatina, 10; taurina, 20; el pH se ajustó a 7.4 con NaOH. Con este procedimiento se alcanzó un 60% de células tolerantes al calcio, las cuales fueron viables durante unas 9 horas después de la disociación.

### 3.3.- TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

Para estudiar las características electrofisiológicas de las células aisladas, se utilizó la técnica de parche de membrana (*patch-clamp*) en el modo de célula entera (*whole-cell*) (Hamill y cols., 1981). Para el estudio de potenciales de acción se utilizó la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*) y para el registro de corrientes iónicas la de fijación de voltaje (*voltage-clamp*).

Las técnicas electrofisiológicas tienen por objeto el estudio de los fenómenos eléctricos ligados al funcionamiento de ciertos tejidos, considerados en su conjunto o en células aisladas. La membrana celular tiene una baja permeabilidad iónica en reposo, pero que aumenta mucho en actividad. Por este motivo, un microelectrodo de cristal, relleno con una solución electrolítica, que se pueda introducir o poner en contacto con una célula nos permitirá medir el potencial, si está unido a un voltímetro; y las corrientes, si está unido a un amperímetro.

De acuerdo con la ley de Ohm, podremos medir la corriente si controlamos el voltaje (*voltage-clamp*), o el voltaje si controlamos la corriente (*current-clamp*). El método de fijación de corriente permite medir las variaciones en el voltaje a consecuencia de la aplicación de una corriente externa. De esta forma, se obtienen potenciales de acción, que son un reflejo de las corrientes iónicas celulares. Con el método de fijación de voltaje podemos estudiar las corrientes que fluyen al potencial que determinemos en el experimento.



Las técnicas macroscópicas estudian los fenómenos eléctricos de una célula, sin disociarla de las que la rodean, gracias a la introducción de un microelectrodo de cristal, relleno con una solución conductora, normalmente de KCl, en una pequeña porción de tejido bañado en una solución fisiológica y oxigenada hasta alcanzar el interior de ella. Los principales inconvenientes de esta técnica (Beeler y McGuigan, 1978), estriban en el hecho de que es difícil modificar el medio externo de cada célula individual, lo cual hace muy difícil el estudio de una corriente aislada de las otras. Además, por el reducido espacio de difusión, la heterogeneidad eléctrica espacial debida a la complejidad morfométrica, y la propagación de la corriente a todas las células vecinas, resulta muy difícil el control adecuado del voltaje. Sin olvidar los fenómenos de acumulación o depleción iónica en el reducido espacio extracelular, teniendo en cuenta las invaginaciones de la membrana (Attwell y cols., 1979). Para salvar estos inconvenientes metodológicos se desarrollaron las técnicas en célula aislada.

### 3.3.1.- PATCH-CLAMP

La técnica de patch-clamp ha revolucionado el estudio de los canales iónicos. En 1976, Neher y Sakmann publicaron la primera corriente grabada de una membrana biológica. En 1981 describieron el método de "sello gigante" (*giga seal*) mejorado (Hamill y cols., 1981) y en 1982 cerca de 25 laboratorios publicaron artículos utilizando esta técnica. En sólo unos años, la mayoría de los mejores laboratorios que trabajaban en biofísica de membranas, cambiaron de las medidas macroscópicas a microscópicas.

El nombre de patch-clamp significa "parche de membrana". Se llama así, porque con él se estudian las corrientes que pasan a través de una porción (parche) de membrana. Esta porción puede ser muy pequeña, en el caso de parches aislados (también llamadas de canal único porque en el pequeño parche suele haber 1, 2 ó 3 canales iónicos).

#### *Métodos de patch-clamp*

Esta técnica es versátil siendo posibles cuatro configuraciones (fig. 8). Es necesario la utilización de una micropipeta que estará rellena con una solución conductora similar al líquido intracelular en unos casos, o al líquido extracelular en otros, en el cual se pueden

añadir bloqueantes o moduladores farmacológicos de determinadas corrientes, según interese para el registro que queremos hacer.

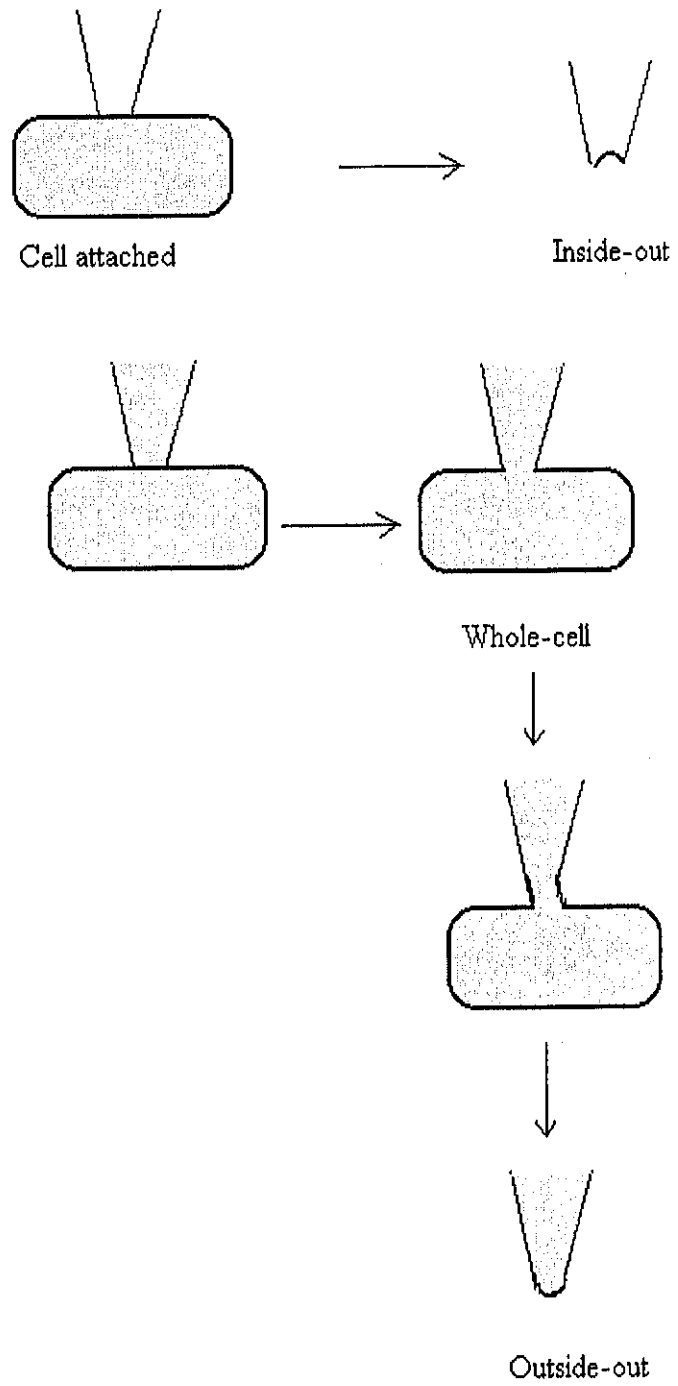
### *On-cell patch*

La pipeta se acerca a la célula (siempre con presión positiva en el interior para evitar el intercambio iónico con el líquido que baña a las células) y se coloca en contacto con la membrana celular. En este punto se suprime la sobrepresión y se hace una suave aspiración a fin de que los bordes de la pipeta se "sellen" a la membrana celular y se consiga lo que se llama sello de alta resistencia (ver fig.8). Cuando se ha conseguido, la resistencia al paso de corriente entre el interior de la pipeta y el líquido externo que baña las células, es muy alta, del orden de gigaohm. En este momento nos encontramos en configuración de *cell attached*, en la cual se pueden registrar las corrientes que pasen a través del "parche" de membrana que queda delimitado por los bordes de la pipeta. Así es posible estudiar el parche en su sitio (*on-cell patch*). En esta configuración, la solución de la pipeta será de características similares al líquido extracelular. Pero sólo podemos controlar el medio externo del parche estudiado.

### *Inside-out*

Una vez que nos encontramos en la configuración de *cell-attached*, tirando de la pipeta, podemos escindir el parche del resto de la célula y así estudiar el o los canales aislados. Esta configuración se llama *inside-out* porque la parte intracelular del parche queda en la parte exterior de la pipeta. En este caso la solución que llena la pipeta, también será el medio extracelular y la que se utiliza en el baño, la intracelular.

En otros casos, la pipeta se rellena con líquido similar al intracelular y se procede como en la primera configuración. Una vez que se ha conseguido el "sello", se ejerce una succión desde el interior de la pipeta, de forma que el "sello" se "rompe", quedando el interior de la pipeta en contacto con el citoplasma. Es la configuración de célula entera o *whole-cell*. Con ella se puede estudiar la corriente que pasa a través de toda la membrana celular, por lo que el número de canales es el total, la corriente será mayor y tendremos



**Fig. 8:** Esquema representativo de las distintas configuraciones de patch-clamp.

### *Whole-cell*

menos interferencias con el ruido eléctrico. En este caso, la corriente registrada será proporcional a: la corriente unitaria, el número de canales, y la probabilidad de apertura de estos canales. El medio extracelular, y el intracelular en parte, pueden ser controlados, de forma que podemos aislar la corriente que queramos estudiar añadiendo adecuados bloqueantes del resto, o simplemente, sustituyendo los iones que no interesen con otros que no atraviesen la membrana celular. El medio intracelular puede ser en parte controlado, puesto que el volumen de la solución que llena la pipeta es mucho mayor que el volumen intracelular, y se pueden dializar los componentes (al menos los inorgánicos). El inconveniente es que por este equilibrio entre el medio intracelular y el que nosotros controlamos, se pueden perder componentes intracelulares (como segundos mensajeros). Es la configuración que hemos utilizado para realizar los experimentos de la presente tesis.

### *Outside-out*

Desde la configuración de célula entera es posible llegar a otra configuración de parche aislado, tirando de la pipeta. En este caso el lado extracelular de la membrana queda en el exterior de la pipeta, por lo que se llama en inglés *outside-out*.

### 3.3.2.- EQUIPO UTILIZADO

Para realizar la técnica de *patch-clamp*, hemos utilizado un amplificador para controlar la corriente o el voltaje, según se trate de *voltage-clamp* o *current clamp* y que amplifique lo suficiente la señal eléctrica con que responde la célula (las corrientes son del orden de pA y el potencial de mV) para poder ser medida y analizada. El amplificador utilizado fue un Axopatch-1D con un preamplificador CV-4 1/100 (Axon Instruments, Foster City, CA USA) controlado por un ordenador (IBM PC-AT) equipado con una tarjeta de conversión analógico-digital Labmaster TL 1 (125 kHz). Las corrientes de membrana fueron registradas con la ayuda de un programa de ordenador comercial, pClamp, versión 5.5.1. (Axon Instruments). El análisis y registro de los potenciales de acción se realizó con ayuda de un programa diseñado especialmente para nuestros experimentos.

Las pipetas de patch-clamp fueron fabricadas a partir de capilares de hematocrito de 1.5 - 1.6 mm de diámetro externo, con un estirapipetas programable modelo P-87 (Sutter Instruments Co.). La resistencia final de la pipeta fue de fue de 1-3 M $\Omega$ .

### 3.3.3.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron sobre los miocitos aislados tolerantes al calcio, a temperatura ambiente (24-27°C), después de un tiempo de estabilización desde la disociación, que varió entre 30 min - 1 h. Se eligió la temperatura ambiente para enlentecer las cinéticas de las corrientes objeto de estudio y poderlas separar de las corrientes capacitativas, además de mejorar el control de voltaje. Una alícuota de la suspensión de las células ventriculares que teníamos en la solución de almacenamiento se colocó en una cámara para registro montada en la platina de un microscopio invertido Olympus IMT-2. Esperamos unos 5 minutos para permitir que las células se fijaran al fondo del cubreobjetos de cristal que formaba el fondo de la cámara y después se perfundieron, a un flujo constante de 2 ml/min, con distintas soluciones, según el experimento a realizar (ver sección soluciones, más adelante). Para controlar el flujo de la perfusión se utilizó una bomba peristáltica Eyela MP 3, de 4 vías para permitir de forma rápida el cambio de solución.

Los registros eléctricos se realizaron utilizando el método de *whole-cell patch-clamp* descritos por Hamill y cols. en 1981. Como hemos explicado anteriormente, la pipeta, rellena de distintas soluciones según el experimento a realizar (ver sección soluciones), con presión positiva, se introdujo en el líquido de perfusión, donde se ajustó a cero la diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la pipeta, de forma manual. Seguidamente, se colocó la punta de la pipeta sobre la superficie celular (gracias a un micromanipulador Narishigue), se eliminó la sobrepresión y se ejerció una presión negativa para conseguir el sello de alta resistencia, lo cual se vio en un osciloscopio Techtronix 5110 (durante todo el tiempo se habían estado dando pulsos de 5 mV y en el osciloscopio se veía la corriente en respuesta a este potencial entre el interior de la pipeta y el líquido de perfusión, cuando el sello se ha conseguido, no se ve corriente alguna en respuesta al potencial aplicado, debido a la gran resistencia del sello conseguido). En este momento, pasamos a la configuración de *whole-cell*, rompiendo, mediante una succión brusca, la parte de membrana delimitada por

los bordes de la pipeta (fig. 8). Antes de comenzar con el estudio electrofisiológico, esperamos unos 5 min para permitir la diálisis del líquido intracelular con el líquido de la pipeta.

La capacitancia y la resistencia en serie fue medida en cada célula aplicando pulsos de  $\pm 10$  mV de 5 ms de duración, desde su potencial de reposo (potencial de la célula cuando la corriente era 0).

La capacitancia (fig. 9), medida indirecta de la superficie de la célula ( $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) se calculó por la fórmula:

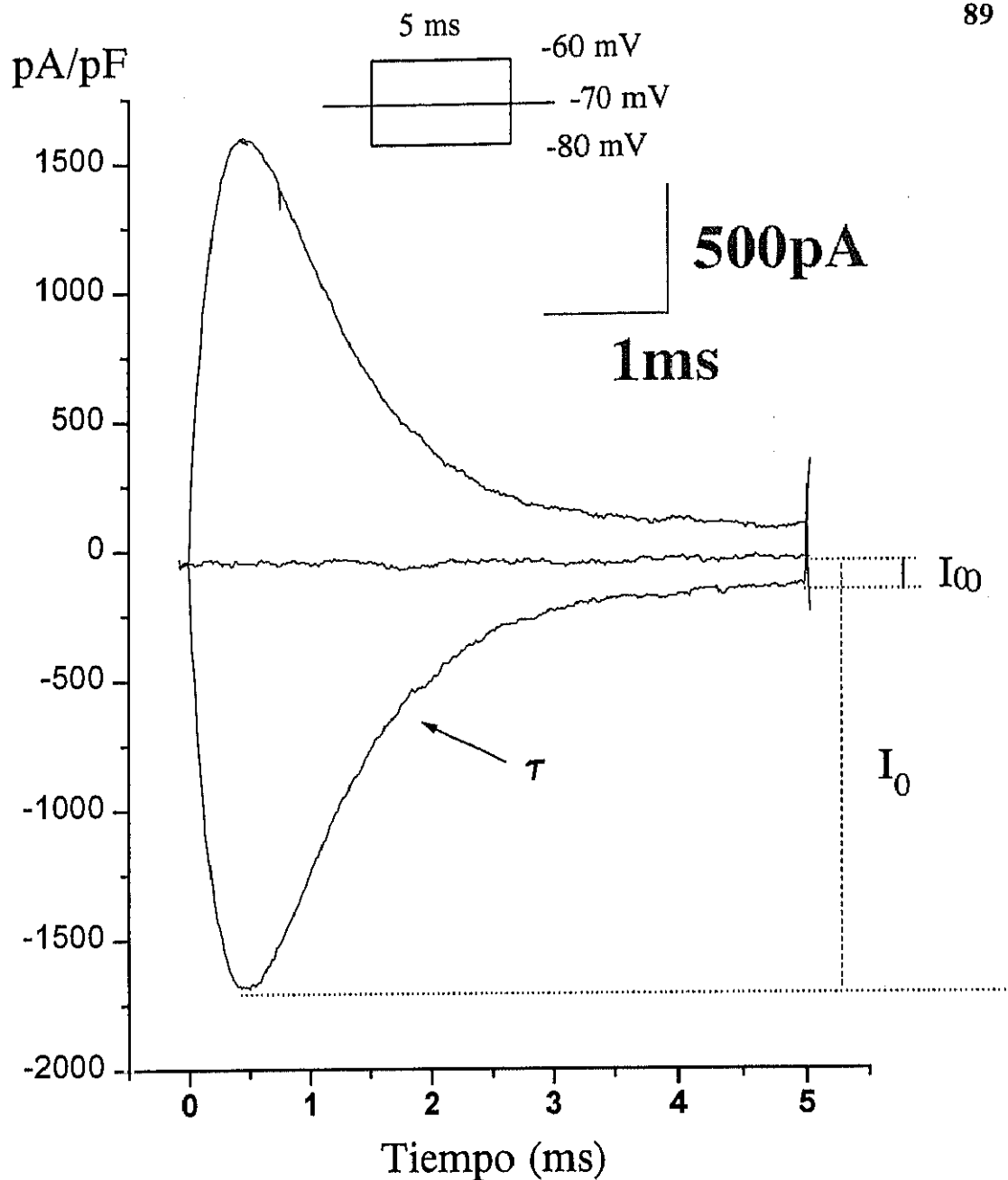
$$C_m = \tau_c I_0 / \Delta V_m (1 - (I_\infty / I_0))$$

donde  $C_m$  es la capacitancia de membrana,  $\tau_c$  la constante de tiempo de caída de la capacitancia,  $I_0$  es el máximo valor de corriente,  $\Delta V_m$  es la amplitud del pulso de voltaje, y  $I_\infty$  es la amplitud al final del pulso (Reuter y Scholz, 1977).

Los restantes protocolos utilizados (potenciales de acción,  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$ , e  $I_{K1}$ ) serán explicados en la correspondiente sección de resultados.

### 3.4.- SOLUCIONES EMPLEADAS

Las soluciones empleadas para la disociación fueron detalladas en la sección de disociación de miocitos cardíacos (3.2). Para el registro electrofisiológico se emplearon distintas soluciones externas (bañando a las células) e internas (rellenando la micropipeta) (ver tablas 3 y 4). Ambas soluciones deben imitar las composiciones iónicas del líquido extra e intracelular respectivamente. Sin embargo, para el estudio de una determinada corriente iónica es necesario aislarla de las demás. Ésto se puede conseguir por medio de determinados bloqueantes o por la ausencia de los iones portadores de la carga en las corrientes contaminantes, sustituyéndola de forma equimolar por otros iones incapaces de atravesar la membrana celular. Para mantener el pH en ambas soluciones hemos utilizado HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina N-[2-etansulfónico]. Y como sustrato metabólico, la glucosa.



**Fig. 9:** Ejemplo de la medición de la capacitancia de membrana en una célula. El protocolo está indicado en la figura.  $I_0$ , es el valor máximo de corriente;  $I_\infty$ , es la corriente al final del pulso;  $\tau$ , la constante de tiempo de caída de la corriente capacitativa, ajustando el trazo de caída de corriente a una función monoexponencial. En cada célula se calculó la capacitancia de membrana para los dos pulsos (10 mV positivos y negativos al potencial de reposo), y la capacitancia se tomó como el valor medio de ambos.

3.4.1.- SOLUCIONES EXTERNAS

Para eliminar la contaminación con las corrientes de sodio, éste ión se substituyó de forma equimolar por colina. De este modo, se eliminaron las corrientes de potasio activadas

**Tabla 3:** Soluciones externas utilizadas para el registro de  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{K1}$ , y PA (potenciales de acción). Bloq., bloqueante.

COMPUESTO	Concentración (mM)			
	PA	$I_{Ca}$	$I_{to}$	$I_{K1}$
Colina		135	135	135
MgCl <sub>2</sub>	1.1	1	1.1	1.1
ClCs		20		
Glucosa	10	10	10	10
Hepes	10	10	10	10
4-AP		3		3
CaCl <sub>2</sub>	1.8	1.8	1.8	1.8
KCl	4		4	4
ATROPINA SO <sub>4</sub>				0.01
CoCl <sub>2</sub>			2	2
ClNa	135			
Manitol	0.4		0.4	0.4
	pH=7.4 con LiOH	pH=7.4 con CsOH	pH=7.4 con KOH	pH=7.4 LiOH
Bloq. CdCl <sub>2</sub>		2		
Bloq. 4-AP	3		3	
Bloq. Cl <sub>2</sub> Ba				2
Bloq. CoCl <sub>2</sub>	3			
COLINA	135			
ATROPINA	0.01			



por sodio, corrientes transitorias generadas por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Lefevre y cols., 1991) y corrientes provocadas por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . La corriente de calcio se bloqueó con  $\text{CoCl}_2$  3mM o  $\text{CdCl}_2$  2 mM y las de potasio con  $\text{BaCl}_2$  2 mM, o 4-AP 3 mM para la corriente transitoria de salida. El manitol se utilizó para aumentar la osmolaridad cuando fue necesario.

Para estudiar el efecto agudo de captopril sobre cada corriente, primero se registró la corriente objeto de estudio como control, y luego se añadió a la solución correspondiente,  $10^{-5}$  M de este fármaco.

3.4.2.- SOLUCIONES INTERNAS

Las soluciones internas deben ser compatibles con el medio intracelular, respetando en la medida de lo posible su composición iónica. La concentración de calcio libre intracelular es muy baja (del orden de  $10^{-8}\text{M}$ ) por lo que sólo se puede mantener con la ayuda

**Tabla 4:** Soluciones internas utilizadas en los distintos protocolos.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mM)			
	PA	$I_{\text{Ca}}$	$I_{\text{to}}$	$I_{\text{K1}}$
KCl	130		150	130
$\text{MgCl}_2$	1	1	1	0.5
HEPES	5	10	5	5
EGTA	5	5	5	5
ATP $\text{Na}_2$		5	5	
GLUCOSA	10		10	10
FOSFOCREATINA	<u>5</u>		<u>5</u>	5
GTP		<u>0.5</u>		
ATP <sub>2</sub> K	<u>5</u>	<u>5</u>		5
CsCl			<u>120</u>	
	pH=7.2 con LiOH	pH=7.2 con CsOH	pH=7.2 con KOH	pH=7.2 con LiOH

de queladores. En nuestros experimentos hemos utilizado EGTA (ácido etilén glicol bis (b aminoetil éter) NNN'N' tetraacético. Ésto facilita alcanzar la configuración de *whole-cell* (Marty y Neher, 1983) y minimiza las corrientes activadas por calcio, así como la corriente del intercambiador sodio/calcio. El potasio, ión principal del medio intracelular, lo hemos sustituido, en los experimentos destinados al estudio de la  $I_{Ca}$ , con cesio, para eliminar las corrientes de salida de potasio. Además, como compuestos de alto contenido energético, hemos utilizado ATP, GTP y fosfocreatina.

### 3.5.- TRATAMIENTO CRÓNICO CON CAPTOPRIL

Para estudiar la posible prevención de la hipertrofia cardíaca con captopril, se realizó un tratamiento vía oral, que empezó dos días después de la operación, y duró hasta el momento en que los animales fueron sacrificados para la realización de los experimentos. El captopril fue administrado disuelto en el agua de bebida. Todas las semanas se pesaron los animales y se midió el agua ingerida en un día, de esta forma, la dosis de captopril fue ajustada semanalmente de acuerdo con la ingesta de agua por Kg de animal (Richer y cols., 1992).

El tratamiento crónico se realizó utilizando dos dosis: una dosis no hipotensora, pero capaz de inhibir el ECA, y otra dosis suficiente para producir un efecto antihipertensivo. Para determinar la eficacia de estas dosis, fue necesario medir la presión arterial en los animales, medición que realizamos en la carótida del animal.

#### 3.5.1.- MEDICIONES DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Las mediciones de presión arterial fueron realizadas en la carótida, en animales anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), vía intraperitoneal, ya que se ha demostrado que las medidas de presión arterial, obtenidas bajo anestesia con pentobarbital sódico, no son significativamente distintas de las obtenidas en animal consciente (Owen y Reidy, 1985). El método tradicional, de medida en la cola, no fue posible, puesto que las ratas con estenosis aórtica tienen una caída de presión a través del clip, y la medida en la cola no es representativa de la presión a que se encuentra sometido el corazón.

Al tiempo del experimento, los animales fueron anestesiados y la arteria carótida y la vena yugular del lado contrario fueron canuladas. La cánula de la carótida se conectó a un transductor de presión (previamente se había administrado a la rata 150 UI/Kg de heparina sódica). Los datos fueron registrados en un ordenador gracias a un programa para tal efecto de PANLAB C data system (Barcelona). Después de unos 5 min de estabilización, la presión basal se registró durante un período de 3 min, tiempo al cual, se administró por el catéter de la vena yugular 1  $\mu\text{g/Kg}$  de angiotensina I (AT I). El incremento en la presión arterial, después de la administración intravenosa de AT I, es una medida indirecta de la actividad del ECA, puesto que es la AT II, producida por la acción del ECA sobre la AT I, la que tiene acción presora. La respuesta a AT I fue rápida, alcanzando el máximo en el primer minuto tras su administración, y transitoria, volviendo a situación basal en los siguientes 3 minutos (Baker y cols., 1990).

Los estudios se realizaron con dos dosis diferentes de captopril. La primera de ellas fue una dosis de probada eficacia hipotensora (Pfeffer y cols., 1982). La segunda fue una dosis suficiente para inhibir significativamente el enzima de conversión de angiotensina, pero insuficiente para bajar la presión arterial media. Para hallar esta segunda dosis, se evaluó el efecto de distintas dosis de este fármaco, en experimentos preliminares, sobre la presión arterial y la inhibición del ECA. La medición de la presión arterial se realizó de la forma que se acaba de explicar, y la acción en la ECA se evaluó de forma indirecta, determinando la respuesta presora a la AT I (1  $\mu\text{g/Kg}$ , intravenosa). Varios grupos de ratas Sprague-Dawley machos (350-500 g), recibieron distintas dosis orales de captopril (5, 10, 15, 20, 30 y 400 mg/Kg), disuelto en el agua de bebida, durante 4-6 días. Estos animales se compararon con grupos controles, que no recibieron captopril. La dosis alta, de 400 mg/Kg, es la dosis correspondiente a los 2 g/l de agua de bebida utilizada por Pfeffer y cols. (1982), de probada eficacia hipotensora, sus efectos en la presión arterial y en la inhibición del ECA, se consideraron máximos.

### 3.5.2.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en cuatro grupos. Un grupo de animales (grupo I) sufrió estenosis aórtica y otro operación simulada (grupo II). Estos dos grupos fueron utilizados como controles. A los dos grupos restantes se les constriñó la aorta abdominal y

recibieron captopril crónicamente en el agua de bebida, desde el día segundo posterior a la operación, hasta el día de su sacrificio para experimentos. Uno de estos dos grupos recibió captopril en la dosis no hipotensora capaz de inhibir significativamente el ECA (16 mg/Kg) (grupo III), y el otro la dosis hipotensora (400 mg/Kg) (grupo IV). Pasadas 7 semanas, un lote de animales de cada grupo fue utilizado para la determinación de la presión arterial y el resto de los animales fueron sacrificados y sus corazones extraídos para la disociación de miocitos y posterior análisis electrofisiológico. Excepcionalmente, datos de presión arterial y corrientes iónicas fueron obtenidos en el mismo animal.

### 3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales han sido expresados como media  $\pm$  la desviación estándar (DSM), y, para mayor claridad, como medias  $\pm$  el error estándar (ESM) en las gráficas.

Los niveles estadísticos de significancia ( $p < 0.5$ ) fueron evaluados por análisis de varianza (test de la F) y la comparación entre grupos se realizó utilizando la  $t$  de Student o test de comparaciones múltiples, según fuera apropiado.

## **4.- RESULTADOS**

---

---

#### 4.1.- ESTUDIO TOPOGRÁFICO DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN EN CÉLULAS VENTRICULARES PROCEDENTES DE CORAZONES NORMALES E HIPERTRÓFICOS

Basándonos en los estudios de Watanabe y cols. (1983), quienes describieron una heterogeneidad en la duración del potencial de acción (DPA) en los ventrículos de rata, y los de Keung y Aronson (1981), quienes observaron que el proceso de la hipertrofia afecta de forma diferente a la DPA de células de distinta localización ventricular, decidimos investigar las características de los potenciales de acción en las células normales e hipertróficas de tres regiones distintas: el ápex, la pared libre izquierda y el septum interventricular.

##### 4.1.1.- CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Los potenciales de acción fueron registrados en 46 células aisladas de 5 corazones de ratas controles y 64 miocitos de 9 corazones hipertróficos. En ambos casos, se estudiaron por separado las células procedentes del ápex, pared libre izquierda, y septum interventricular. La inducción de la hipertrofia y la disociación celular se realizaron según se explicó en la sección de métodos. En este caso, al realizar las operaciones, se pareó cada rata control con dos ratas a las cuales se les colocó un clip en la aorta abdominal, con el fin de asegurarnos un número suficiente de corazones hipertróficos. Para realizar los experimentos, sólo utilizamos aquellos corazones en los que el ratio peso corazón/peso corporal fue superior al 30 %, comparando con los controles (Scamps y cols., 1990).

Como se puede ver en la tabla 6, los pesos de los animales sometidos a una estenosis aórtica, no fueron significativamente distintos de los pesos de los animales controles, sin embargo, el peso de los corazones de los animales con constricción aórtica fue significativamente mayor que el de las controles, lo que hizo que la relación entre el peso del corazón y el peso corporal (ratio), expresado como mg de corazón por g de peso corporal, fue significativamente mayor en el grupo de las ratas con constricción de la aorta abdominal. Ésto nos indica que estos animales habían desarrollado hipertrofia cardíaca. El

**Tabla 6:** Características de las ratas controles e hipertróficas.

	P. ANIMAL (g)	P. CORAZÓN (g)	RATIO (mg/g)
CONTROL (n=5)	498.4 ± 9.5	1.76 ± 0.04	3.5 ± 0.09
HIPERTROFIA (n=9)	472.2 ± 15.1 N.S.	2.32 ± 0.09 p<0.001	4.9 ± 0.13 p<0.0001

P., peso; ratio, cociente entre el peso del corazón en mg y el peso del animal en g. N.S., no significativo. Los datos están expresados como las medias ± ESM.

incremento en el ratio de los animales hipertróficos fue de un 40 % en media ( $3.5 \pm 0.09$  mg/Kg en 5 ratas controles, frente a  $4.9 \pm 0.13$  mg/Kg en 9 ratas con estenosis aórtica). La hipertrofia de los miocitos aislados está confirmada por el incremento en las capacitancias de membrana, las cuales se relacionan con la superficie celular. En media, la capacitancia (ver tablas 7 y 8) de las células aisladas de corazones controles (n=46) fue de 181.94 pF, frente a 259.86 pF en los miocitos de corazones hipertróficos (n=64,  $p<0.0001$ ), lo cual supone un incremento de aproximadamente un 43 %, muy similar al incremento en el ratio, lo cual nos indica que los animales con estenosis de la aorta abdominal desarrollaron una hipertrofia a nivel celular.

#### 4.1.2.- HETEROGENEIDAD TOPOGRÁFICA DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN

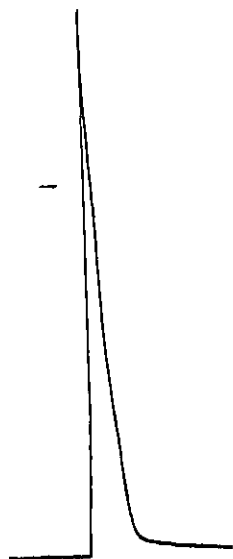
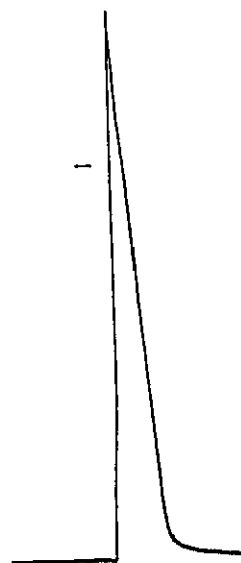
##### 4.1.2.1.- Potenciales de acción en células controles

El registro de los potenciales de acción (PA) se realizó utilizando la técnica de *patch-clamp*, en su método de *whole-cell*, con la configuración de *current-clamp* provista en el amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments). Los potenciales de acción fueron

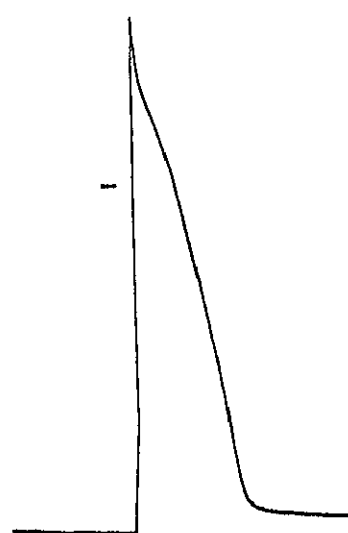
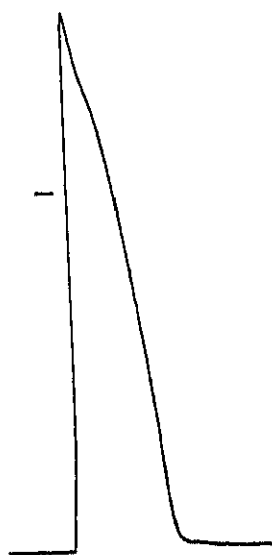
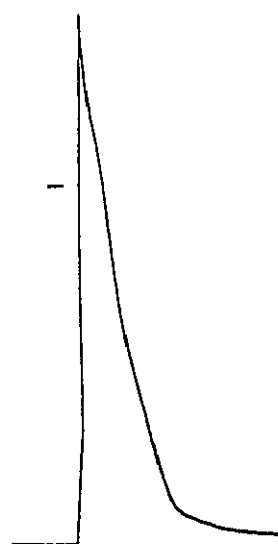
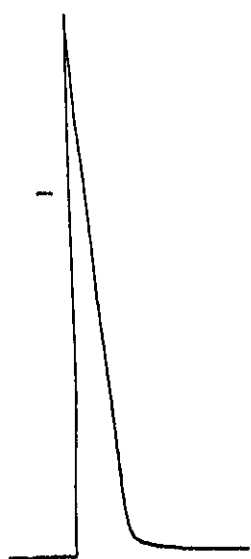
evocados con corrientes despolarizantes de 5 ms de duración, de amplitudes 1.5 veces el umbral de activación, a 1 Hz. Para ello, se utilizó un estimulador Cibertec, CS20. Para registrar y analizar los potenciales de acción, se utilizó un programa de ordenador diseñado para tal efecto. En cada célula se midió el potencial de reposo, la amplitud del potencial de acción y su duración al 20, 50 y 90 % de repolarización. Cada célula se estimuló con corrientes despolarizantes, cada vez mayores, hasta alcanzar el umbral de activación. Una vez encontrado, se multiplicó este estímulo por 1.5, se contaron 10 PA, sin grabar, para que se estabilizaran, y se registraron los siguientes 10 potenciales de acción. La media de los valores de estos potenciales de acción, fue la que se utilizó como datos en cada célula.

Los potenciales de reposo fueron similares en células de distinta procedencia (ver tabla 7), sin embargo, un estímulo superior al umbral, evocó potenciales de acción caracterizados por una rápida despolarización y repolarización, con ausencia de meseta, en el caso de células aisladas de ápex (ver fig 10 A), las células de la pared libre izquierda, mostraron también unos potenciales de acción de corta duración, aunque mayores que los de ápex ( $p < 0.02$ ,  $p < 0.005$ , y  $p < 0.01$ , al 20, 50 y 90 % de repolarización respectivamente). Los potenciales de acción de más larga duración fueron registrados en los miocitos aislados del septum (fig 10 A), donde sí se observó una pequeña meseta en la repolarización del PA. Cuando se compararon estadísticamente las duraciones de los potenciales de acción de las células de ápex y septum se halló una  $p < 0.001$  al 20 % de repolarización, y  $p < 0.0001$  al 50 y 90 % de repolarización. También se encontró diferencia estadísticamente significativa a todos los niveles de repolarización al comparar las células de la pared libre con las de septum (al 20 %  $p < 0.001$ ; al 50 %  $p < 0.02$ ; y al 90 %  $p < 0.05$ ). Para mayor claridad, estos resultados se presentan en forma de histogramas en la fig. 11 (barras blancas). En resumen, nuestros resultados confirman la existencia de una heterogeneidad en la DPA en el ventrículo izquierdo de la rata.



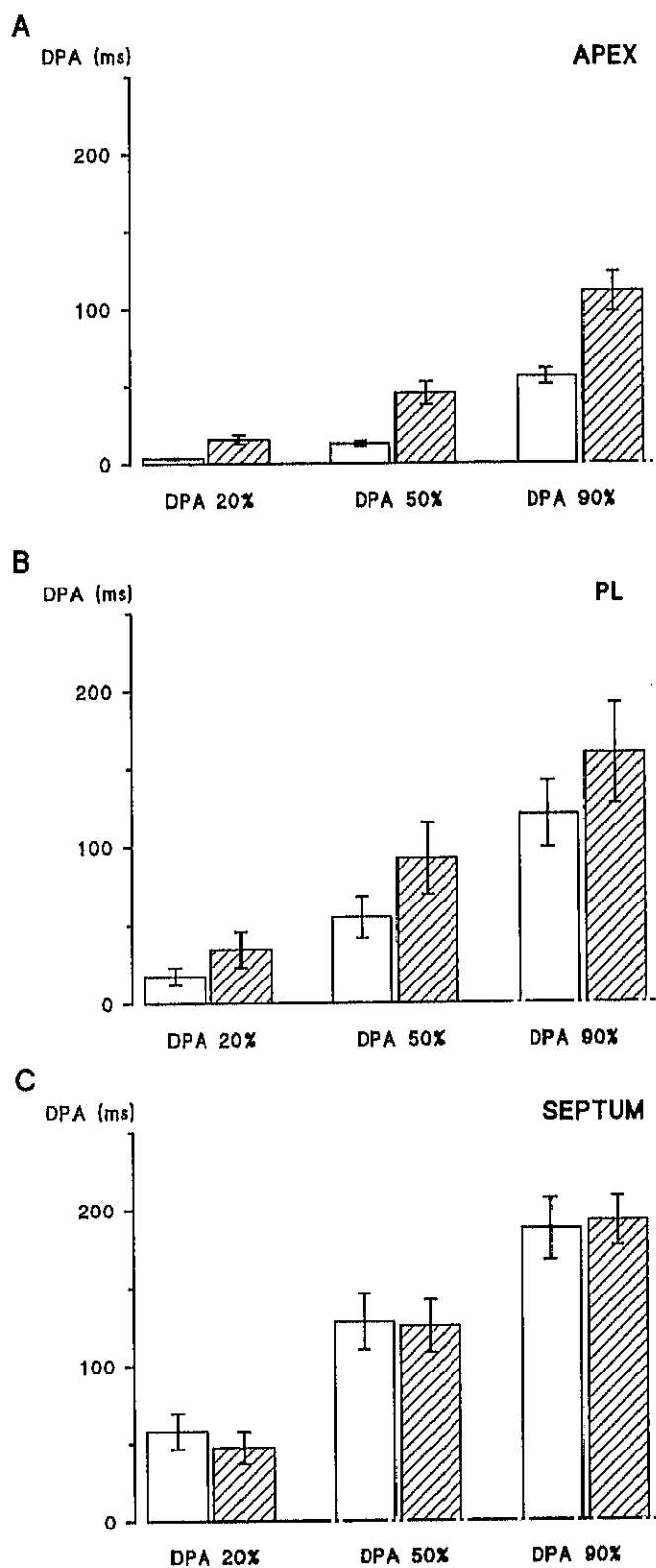
**A****B**

99



25 mV  
200 ms

**Fig 10:** Ejemplo de varios potenciales de acción registrados en células controles (**A**) e hipertróficas (**B**) de ápex (trazos superiores), pared libre (centrales) y septum (inferiores).



**Fig. 11:** Duración del potencial de acción ( $\pm$  ESM) en células aisladas de ápex (panel **A**), pared libre (panel **B**), y septum (panel **C**), de corazones controles (barras blancas) e hipertróficos (barras rayadas), medidas al 20, 50 y 90 % de repolarización.

**Tabla 7:** Características de los potenciales de acción registrados en células aisladas de corazones controles.

	<b>APEX</b> (n=14)	<b>PL</b> (n=15)	<b>SEPTUM</b> (n=17)
<b>C<sub>m</sub></b> (pF)	170.1 ± 11.6	177.5 ± 7.9	193.9 ± 12.8
<b>PR</b> (mV)	-69.3 ± 1.5	-71.79 ± 0.7	-69.7 ± 1.05
<b>Ampl.</b> (mV)	103.8 ± 3.9	110.5 ± 2.6	105.2 ± 3.1
<b>DPA 20%</b> (ms)	3.16 ± 0.3	17.41 ± 5.6	57.7 ± 11.5
<b>DPA 50%</b> (ms)	12.5 ± 1.7	54.6 ± 13.3	127.8 ± 17.9
<b>DPA 90%</b> (ms)	55.84 ± 5.2	120.46 ± 21.5	187.0 ± 20.0

**PL**, pared libre izquierda; **C<sub>m</sub>**, capacitancia de la membrana; **PR**, potencial de reposo; **Ampl.**, amplitud del potencial de acción; **DPA**, duración del potencial de acción. Los valores expresan las medias ± ESM.

#### 4.1.2.2.- Potenciales de acción en células hipertróficas

Los PA registrados en las células hipertróficas, mostraron menor diferencia entre las distintas regiones anatómicas estudiadas, manifestando una tendencia a la homogeneización (ver tabla 8 y fig. 10 B). Aunque en valores medios, las duraciones de los potenciales de acción fueron: ápex < pared libre < septum, sólo hubo diferencias significativas entre las células de ápex y septum (20%  $p < 0.01$ , 50 y 90%  $p < 0.001$ ). Para mayor claridad, estos resultados se presentan en forma gráfica en la figura 11 (histogramas rayados). Al igual que en las células controles, no se observaron cambios en las restantes características estudiadas (capacitancia, potencial de reposo y amplitud del PA) entre miocitos de diferente topografía (ver tablas 7 y 8).

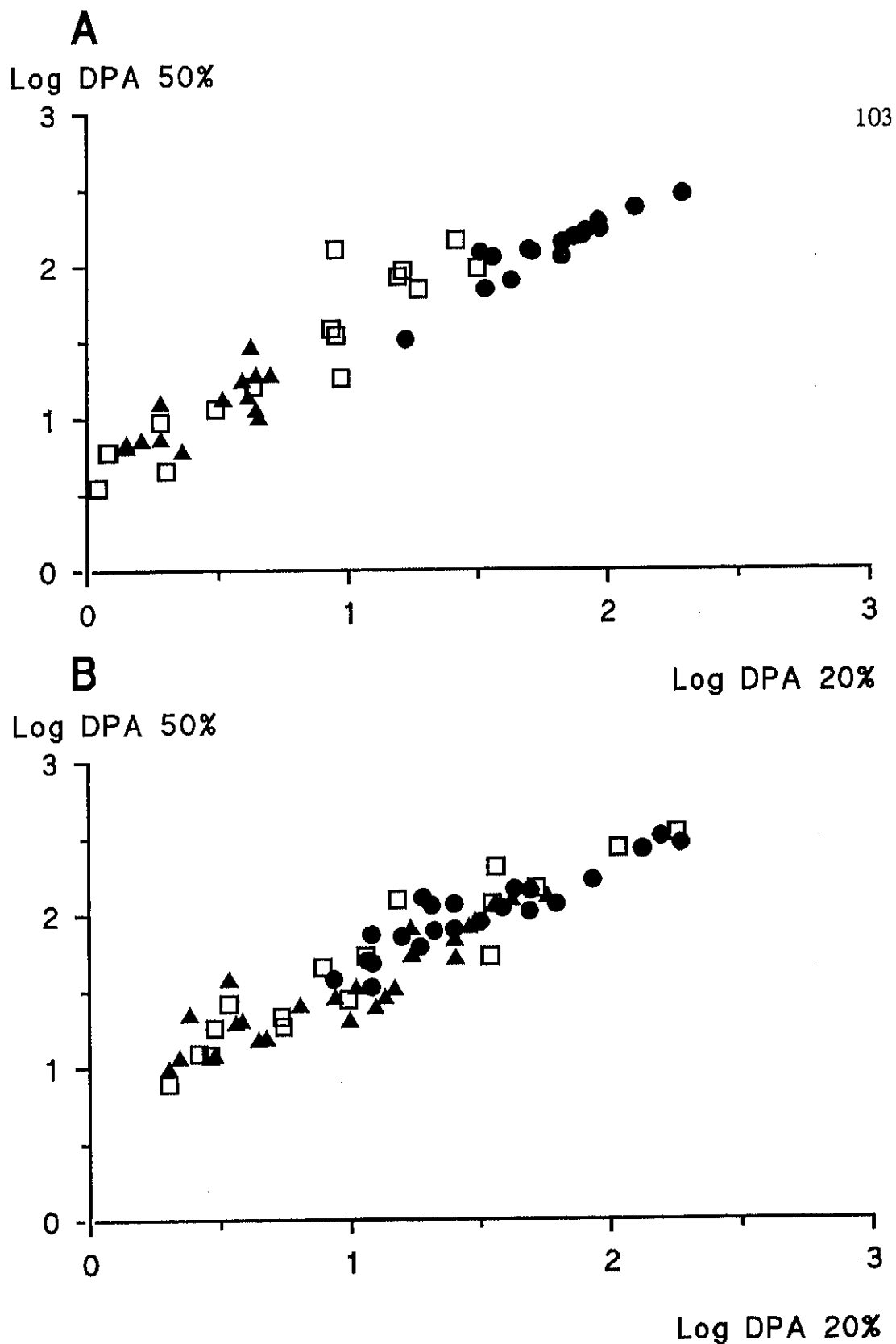
**Tabla 8:** Características de los potenciales de acción registrados en células hipertróficas.

	<b>APEX</b> (n=25)	<b>PL</b> (n=17)	<b>SEPTUM</b> (n=22)
<b>C<sub>m</sub> (pF)</b>	257.6 ± 18.0	280.2 ± 1.6	243.7 ± 14.0
<b>PR (mV)</b>	-70.2 ± 1.0	-69.51 ± 1.6	-69.8 ± 1.08
<b>Ampl. (mV)</b>	103.5 ± 3.6	105.7 ± 2.9	109.2 ± 2.9
<b>DPA 20% (ms)</b>	15.3 ± 2.8	34.3 ± 11.5	47.1 ± 10.6
<b>DPA 50% (ms)</b>	45.1 ± 9.9	92.3 ± 23.1	124.8 ± 16.9
<b>DPA 90% (ms)</b>	110.8 ± 13.0	159.5 ± 32.2	192.04 ± 16.0

**PL**, pared libre izquierda; **C<sub>m</sub>**, capacitancia de la membrana; **PR**, potencial de reposo; **Ampl.**, amplitud; **DPA**, duración del potencial de acción. Los valores expresan las medias ± ESM.

#### 4.1.3.-MODULACIÓN DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN POR LA HIPERTROFIA

En la figura 11 se muestra el efecto de la hipertrofia en la DPA a distintos niveles de repolarización (20, 50 y 90 %) en los miocitos cardíacos aislados del ápex, pared libre y septum. Como se puede observar, la hipertrofia induce un claro aumento en la DPA de las células apicales, que son las de duración más breve en situación control. Las células de la pared libre también experimentaron un aumento de la DPA con la hipertrofia, pero las células del septum no mostraron cambios significativos en la DPA por el desarrollo de hipertrofia (ver tablas 7 y 8). El análisis estadístico indicó un incremento significativo en las duraciones de los PA de ápex ( $p < 0.001$  al 20 y 50 % de repolarización) y pared libre ( $p < 0.05$  al 20 % y  $p < 0.03$  al 50%), pero no se observaron diferencias en el caso de miocitos procedentes de septum. Estos datos hacen que en media, la DPA en las células de ápex estén incrementadas en un



**Fig. 12:** Representación de la duración de los potenciales de acción (en escala logarítmica) registrados en miocitos aislados de corazones controles (A), e hipertróficos (B). Los triángulos corresponden a las células de ápex, los cuadrados de la pared libre del ventrículo izquierdo, y los círculos del septum interventricular.

384 % al 20 % de repolarización, un 260 % al 50 % y un 98 % al 90 %, de forma que el PA resulta más prolongado en las primeras fases de la repolarización. En la pared libre también se prolongó más al principio de la repolarización, aunque en menor proporción: en media, un 97 %, 69 %, y 32 % al 20, 50 y 90 % de repolarización respectivamente. El resto de las características estudiadas no variaron, a excepción de las capacitancias que fueron mayores en el caso de hipertrofia ( $p < 0.001$  en ápex y pared libre, y  $p < 0.02$  en septum) (ver tablas 7 y 8). Dado que los resultados presentados hasta este momento indican una diferencia significativa en las medias de las DPA, de las células de distinta localización en situación control, y no tan claramente en los miocitos hipertróficos, decidimos representar todos los valores experimentales en la figura 12. La observación detallada de dicha figura (panel A) indica claramente la existencia de dos poblaciones de células: el ápex (triángulos) y el septum (círculos). En el caso de la pared libre, los valores de la DPA se encuentran intermedios entre ambas localizaciones, pero acercándose más al ápex. Durante la hipertrofia (fig. 12 B), la imagen observada anteriormente cambia totalmente y ya no se puede hablar de distintos grupos claramente diferenciados, indicando una ausencia de heterogeneidad topográfica.

#### 4.1.4.- SÍNTESIS

Este grupo de experimentos demuestra que en situación fisiológica, las características electrofisiológicas de los miocitos cardíacos del ventrículo izquierdo son distintas según su procedencia topográfica, siendo las duraciones de los potenciales de acción: ápex < pared libre < septum.

Las células aisladas de corazones hipertróficos tienen similares potenciales de reposo y amplitudes, pero su duración está aumentada en el ápex y la pared libre, siendo mayor el incremento en las células de ápex. En ambas, el alargamiento es más marcado en la fase temprana de la repolarización (duración al 20 % de repolarización > 50% > 90 %).

Los miocitos de los corazones hipertróficos tienen menor heterogeneidad, siendo significativamente diferentes sólo las duraciones de los potenciales de acción del ápex y el septum entre sí. Según estas duraciones, los miocitos se podrían ordenar  $\text{ápex} \leq \text{pared libre} \leq \text{septum}$ .

Por todo lo anterior, decidimos estudiar las características de las principales corrientes implicadas en la repolarización del PA de la rata, tanto en situación de normalidad como en hipertrofia. Las corrientes más importantes que contribuyen a la fase temprana de la repolarización del PA en el ventrículo de rata son la  $I_{Ca}$  y la  $I_{to}$ . En la siguiente sección mostramos los resultados obtenidos sobre la  $I_{Ca}$ . Empezamos estudiando esta corriente, ya que no existía ningún estudio sobre la posible implicación de esta corriente en la heterogeneidad en situación de normalidad y los resultados publicados hasta la fecha, sobre la  $I_{Ca}$  en la hipertrofia cardíaca son contradictorios (Keung, 1989; Scamps y cols., 1990; Ten Eik y cols., 1983).

## 4.2.- ESTUDIO DE LA CORRIENTE LENTA DE ENTRADA DE CALCIO

### 4.2.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Los experimentos para el estudio de la corriente lenta de entrada de calcio, tipo L, fueron realizados en células aisladas de los corazones de 5 ratas controles y 4 hipertróficas, teniendo en cuenta el origen topográfico de cada célula: ápex, pared libre izquierda y septum interventricular. Al tiempo de los experimentos, los animales fueron pesados, decapitados, y los corazones extraídos para la disociación de los miocitos. Antes de proceder a la disociación, los corazones fueron pesados, y el ratio peso corazón/peso corporal fue tomado como criterio para la determinación de la hipertrofia cardíaca. El ratio en el grupo control fue de  $3.7 \pm 0.3$  mg/g, y en el grupo con estenosis aórtica fue  $5.1 \pm 0.6$  mg/g ( $p < 0.01$ ), lo que supone un 35.13 % de incremento.

Las capacitancias fueron calculadas según se detalló en la sección de métodos, y sus medias en cada grupo estudiado, se presentan en la tabla 9. Se observó un incremento del 53.88 % ( $151.68 \pm 5.89$ ,  $n=26$ ; *versus*  $233.41 \pm 16.39$ ,  $n=29$ ;  $p < 0.0001$ ), al comparar las capacitancias obtenidas en células controles e hipertróficas. Estos datos indican la presencia de una hipertrofia a nivel celular.

### 4.2.2.- CORRIENTE LENTA DE ENTRADA DE CALCIO

En la corriente de calcio, tipo L, estudiamos la relación corriente-voltaje, activación e inactivación en estado estacionario, reactivación, y curso temporal de activación e inactivación.

Para estudiar la activación de la corriente con respecto al voltaje, sometimos a la célula a pulsos despolarizantes, de 225 ms de duración, desde un potencial de membrana de -70 mV. Estos pulsos fueron desde -50 hasta +60 mV, en incrementos de 10 mV, a intervalos de 10 s. La  $I_{Ca}$  se midió como amplitud (diferencia entre el pico máximo de corriente, y la corriente al final del pulso), a partir de la cual se calculó la densidad de corriente (dividiendo la amplitud entre la capacitancia), en pA/pF.



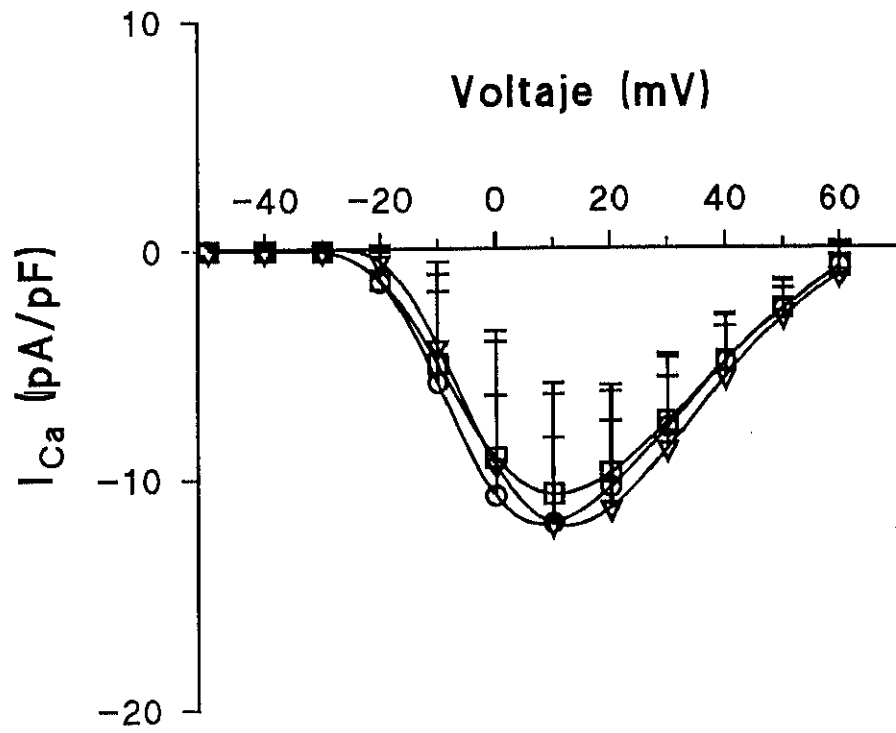
Para aislar la corriente de calcio, se añadió  $\text{Cs}^+$  en las soluciones intra y extracelulares, con el fin de eliminar las corrientes de potasio; y se sustituyó el  $\text{Na}^+$  por colina en la solución externa, para eliminar la corriente de sodio. Para asegurarnos de la naturaleza iónica de la corriente registrada en nuestras condiciones experimentales, en algunos experimentos añadimos a la solución externa, 2 mM  $\text{CdCl}_2$ , conocido bloqueante de calcio, que suprimió esta corriente de entrada (ver soluciones en la sección de métodos).

Las densidades de  $I_{\text{Ca}}$  no fueron significativamente distintas entre los grupos estudiados: ni entre células de ápex, pared libre, y septum; ni entre células controles e hipertróficas (ver tabla 9 y fig. 13). Es decir, no encontramos ninguna modulación de la  $I_{\text{Ca}}$  por el proceso de hipertrofia, pero sí encontramos una gran variabilidad en la densidad de  $I_{\text{Ca}}$  dentro de cada grupo estudiado.

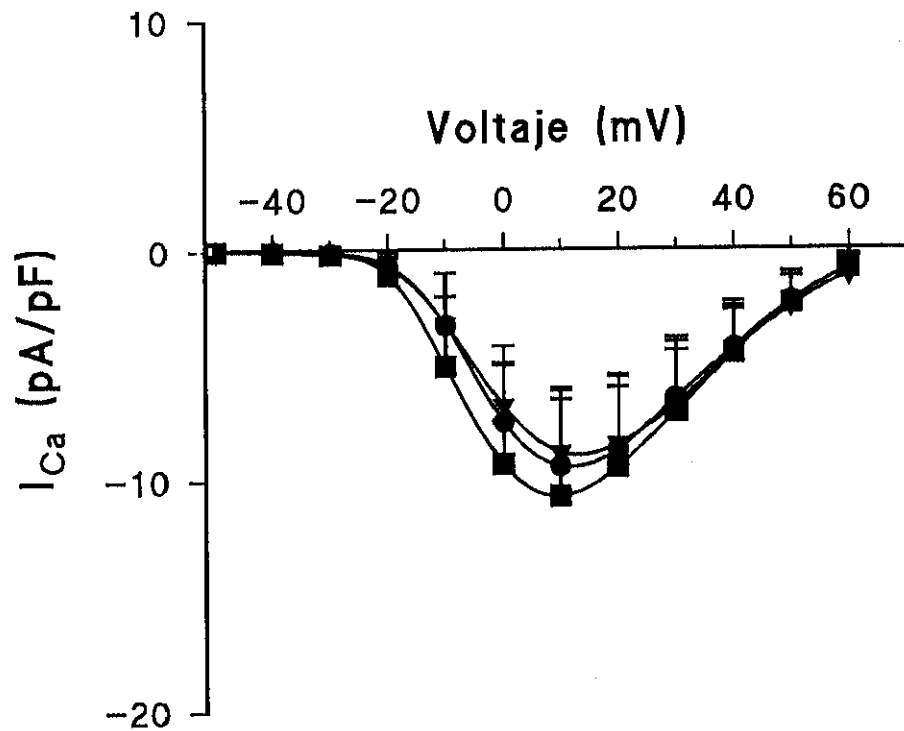
**Tabla 9:** Magnitud de la  $I_{\text{Ca}}$  en células aisladas de corazones controles e hipertróficos

CÉLULA		$C_m$ (pF)	$I_{\text{Ca}}/C_m$ (pA/pF)
APEX	C (n=9)	$139.1 \pm 42.6$	$12.06 \pm 5.65$
	H (n=12)	$214.5 \pm 99.3$	$8.68 \pm 3.02$
PARED LIBRE	C (n=8)	$151.1 \pm 19.1$	$10.81 \pm 4.96$
	H (n=13)	$197.7 \pm 91.0$	$10.69 \pm 4.24$
SEPTUM	C (n=9)	$175.5 \pm 22.6$	$12.14 \pm 3.91$
	H (n=10)	$217.0 \pm 57.9$	$9.97 \pm 4.24$

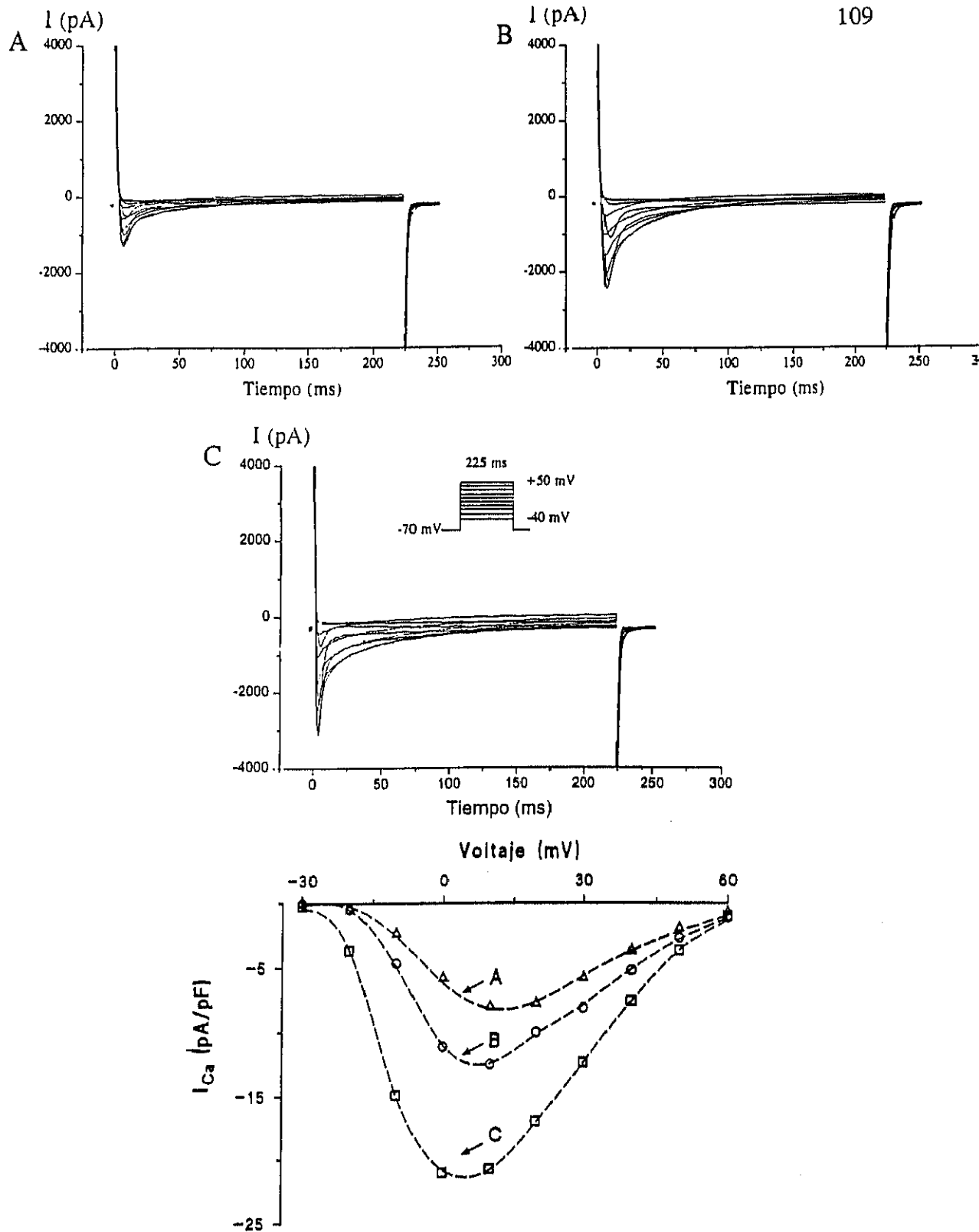
$C_m$ , capacitancia;  $I_{\text{Ca}}$ , corriente de calcio;  $I_{\text{Ca}}/C_m$ , densidad máxima de  $I_{\text{Ca}}$ . C, células controles; H, células hipertróficas. Los valores expresan medias  $\pm$  DSM.

**A**

108

**B**

**Fig. 13:** Relación densidad de corriente-voltaje en células controles (panel A) e hipertróficas (panel B). Los triángulos representan las medias obtenidas en células del ápex, los cuadrados de la pared libre, y los círculos del septum. Los símbolos blancos corresponden a las células controles y los negros células hipertróficas. Las líneas verticales indican la DSM.



**Fig. 14:** Ejemplo de la variación encontrada en la  $I_{Ca}$ . Los paneles A, B y C muestran los registros de esta corriente obtenidos en tres células distintas de la pared libre izquierda de corazones controles. En el panel inferior se representan las curvas densidad de corriente-voltaje de las mismas células. Las capacitancias de membrana fueron, en pF: A, 148.4; B, 180.5; y C, 136.0.

De hecho, en células controles, las densidades de la  $I_{Ca}$  variaron de 6.8 a 22.5 pA/pF, de 5.1 a 21.3 pA/pF, y de 8.9 a 20.7 pA/pF, en ápex, pared libre y septum respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en células hipertróficas, donde las densidades de corriente variaron de 4.9 a 14.1 pA/pF en ápex, de 4.9 a 17.4 pA/pF en la pared libre, y de 5.8 a 14.9 pA/pF en septum. La fig. 14 muestra un ejemplo de la  $I_{Ca}$  registrada en tres células distintas de la pared libre en situación control.

La variabilidad en  $I_{Ca}$ , sólo la encontramos en la amplitud y densidad de corriente, pero no en la dependencia del voltaje ni en la cinética. Observando la curva corriente-voltaje (fig 13), se ve que la  $I_{Ca}$  se activa a potenciales positivos a -30 mV. La corriente máxima de entrada fue registrada a potenciales alrededor de +10 mV (en células aisladas de corazones controles, en mV:  $+12 \pm 4.2$  (n=9),  $+10 \pm 5.7$  (n=8), y  $+8.8 \pm 3.3$  (n=9) en ápex, pared libre y septum respectivamente; y en miocitos aislados de corazones hipertróficos:  $+11.6 \pm 7.7$  (n=12),  $+8.5 \pm 3.7$  (n=13), y  $+10 \pm 0$  (n=10) en ápex, pared libre, y septum respectivamente). El potencial de reversión se determinó por la intersección de la línea de corriente cero, con la regresión lineal de la parte ascendente de la curva corriente-voltaje. Su valor estuvo alrededor de +60 mV en todas las células, siendo en cada grupo, en mV:  $+60.37 \pm 3.6$  en 8 células controles de ápex,  $+60.33 \pm 2.8$  en 9 de pared libre,  $+59.3 \pm 2.7$  en 7 de septum. En los miocitos hipertróficos fue  $+60.77 \pm 4.1$ ,  $+60.3 \pm 4.1$ , y  $+61 \pm 4.3$  mV en 11 de ápex, 13 de pared libre, y 10 de septum respectivamente.

#### 4.2.3.- CINÉTICA DE LA $I_{Ca}$ DEPENDIENTE DEL VOLTAJE

##### 4.2.3.1.- *Activación en estado estacionario*

La dependencia del voltaje de la activación en estado estacionario, se analizó utilizando los valores de conductancia calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Isenberg y Klöckner, 1982):

$$G = I_0 / (V_m - V_{rev})$$

$$d_\infty(V_m) = G / G_{max}$$

donde  $G$  es la conductancia calculada al potencial de membrana  $V_m$ ;  $I_0$  es el pico de  $I_{Ca}$ ;  $V_{rev}$  es el potencial de reversión aparente,  $d_\infty(V_m)$  es el parámetro de activación en estado estacionario de  $I_{Ca}$ ; y  $G_{max}$  es el valor máximo de conductancia.

Los datos de  $d_\infty(V_m)$  fueron ajustados a una distribución de Boltzmann de la forma:

$$d_\infty(V_m) = 1 / (1 + \exp (V_{0.5} - V_m) / k)$$

donde  $V_{0.5}$  es el potencial al cual  $I_{Ca}$  está activada la mitad de su valor máximo y  $k$  es la pendiente de la curva de activación en el punto de inflexión. Puesto que en el tiempo hasta el valor de pico utilizado para el cálculo es posible alguna inactivación y los valores de  $V_{0.5}$  y  $K$  son extrapolados, estos datos se deben considerar como una aproximación.

Los datos obtenidos de la activación en estado estacionario, con respecto al voltaje se resumen en la tabla 10 y las curvas se representan en la fig. 15. No se observaron diferencias significativas entre células de diferente topografía (y esto no se modificó con el desarrollo de la hipertrofia) ni en el potencial umbral de activación, ni en el potencial al cual la activación fue la mitad de la máxima, ni en la pendiente de la curva de activación.

**Tabla 10:** Datos obtenidos de la curva de activación en estado estacionario de la  $I_{Ca}$  en células de corazones controles e hipertróficos.

CÉLULA		$V_u$ (mV)	$V_{0.5}$ (mV)	$k$
A	C (n=9)	$-18.9 \pm 3.3$	$-1.24 \pm 3.80$	$5.83 \pm 0.49$
	H (n=11)	$-23.6 \pm 6.7$	$-0.96 \pm 4.61$	$6.29 \pm 0.78$
PL	C (n=7)	$-21.4 \pm 3.7$	$-1.42 \pm 3.50$	$6.11 \pm 0.70$
	H (n=13)	$-27.7 \pm 4.4$	$-3.82 \pm 2.80$	$5.95 \pm 0.67$
S	C (n=8)	$-22.5 \pm 4.6$	$-3.13 \pm 1.80$	$5.59 \pm 0.92$
	H (n=10)	$-23 \pm 4.8$	$-2.02 \pm 2.62$	$5.99 \pm 0.60$

A, ápex; PL, pared libre; S, septum; C, células controles; H, células hipertróficas;  $V_u$ , voltaje umbral de activación;  $V_{0.5}$ , voltaje de semiactivación;  $k$ , pendiente de la curva de activación en su punto de inflexión. Valores medios  $\pm$  DSM.

#### 4.2.3.2.- Inactivación en estado estacionario

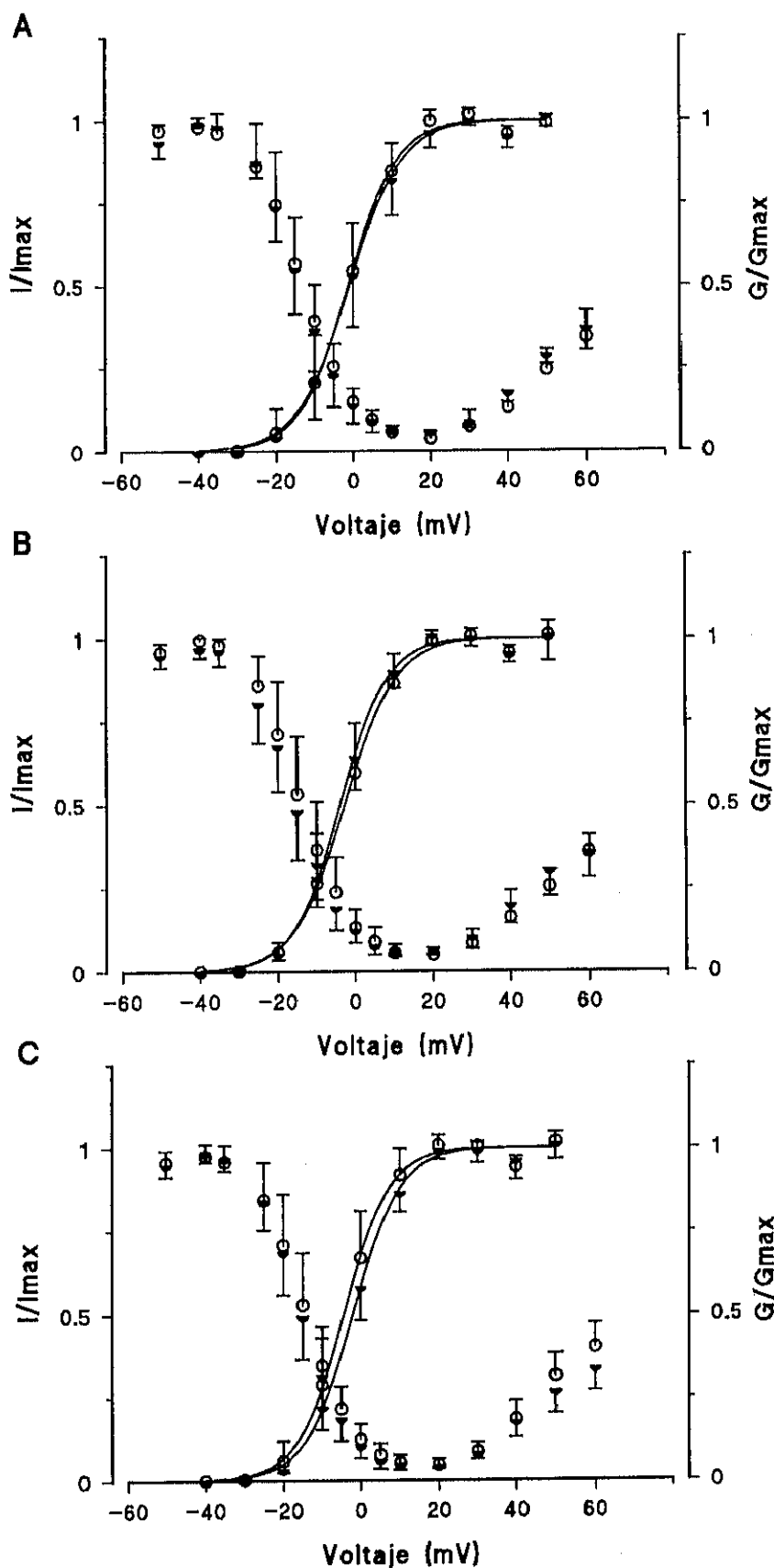
La inactivación en estado estacionario dependiente del voltaje, se determinó usando un protocolo de doble pulso: Desde un potencial de membrana ( $V_h$ ) de -70 mV, se dieron pulsos condicionantes de 2000 ms de duración que fueron desde -60 a +60 mV, en incrementos de 5 mV. Después de cada pulso condicionante, se volvió al  $V_h$  durante 3 ms, para permitir mayor separación entre la corriente y la variable capacitativa, y se dio un pulso test a +10 mV (por ser aproximadamente el potencial al cual la  $I_{Ca}$  fue mayor), de 225 ms de duración. Los datos se normalizaron dividiendo la corriente obtenida con el pulso test entre la de mayor valor.

La inactivación en estado estacionario es función del potencial de membrana en células controles e hipertróficas. En todas las células estudiadas, la corriente disminuyó cuando el pulso condicionante fue desde -60 a +10 mV, pero, a potenciales

**Tabla 11:** Parámetros de la curva de inactivación en estado estacionario, en células controles e hipertróficas.

		$V_{0.5}$ (mV)	k	$V_{max}$ (mV)	$I_{res}$ (%)
A	C (n=9)	$-12.99 \pm 4.38$	$-6.84 \pm 1.52$	$20.0 \pm 5.0$	$3 \pm 1$
	H (n=9)	$-12.88 \pm 3.57$	$-6.52 \pm 1.08$	$16.1 \pm 7.8$	$5 \pm 2$
PL	C (n=8)	$-13.61 \pm 4.24$	$-6.56 \pm 1.26$	$16.6 \pm 4.9$	$5 \pm 2$
	H (n=12)	$-14.73 \pm 3.85$	$-6.85 \pm 1.31$	$16.7 \pm 6.2$	$6 \pm 1$
S	C (n=9)	$-14.24 \pm 4.17$	$-6.62 \pm 1.01$	$15.6 \pm 4.9$	$5 \pm 2$
	H (n=11)	$-14.79 \pm 3.57$	$-6.85 \pm 0.75$	$14.1 \pm 5.8$	$4 \pm 2$

Células de ápex (A); pared libre (PL); y septum (S); en situación control (C) e hipertrofia (H).  $V_{0.5}$ , voltaje al cual la inactivación es la mitad de la máxima; k, pendiente de la curva de inactivación;  $V_{max}$ , voltaje al cual la corriente está máximamente inactivada;  $I_{res}$ , porcentaje de la corriente residual (no inactivada) en relación a la máxima. Los valores están expresados en media  $\pm$  DSM.



**Fig. 15:** Superposición de las corrientes de activación ( $G/G_{max}$ ) e inactivación ( $I/I_{max}$ ) en estado estacionario en células controles (círculos) e hipertróficas (semicírculos), de ápex (A), pared libre (B), y septum (C). La línea continua es la ecuación de Boltzmann que mejor se ajusta a los valores medios de la activación (ecuación en el texto).

mayores de +10 mV, aumentó (fig 15). El potencial condicionante que más inactivó la corriente no fue significativamente distinto entre grupos (tabla 11,  $V_{max}$ ), tampoco fueron distintos el potencial al cual la corriente fue inactivada al 50 % ( $V_{0.5}$ ), ni la pendiente de la curva de inactivación como función del potencial condicionante ( $k$ ). La inactivación máxima no fue completa (no se alcanzó el 100 % de inactivación), quedando una corriente residual ( $I_{res}$ ) en la cual tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados. Los valores medios se resumen en la tabla 11. Los valores de potencial de semiactivación y pendiente, se calcularon ajustando los puntos de la curva de activación desde el principio hasta el de máxima inactivación a una curva de boltzmann.

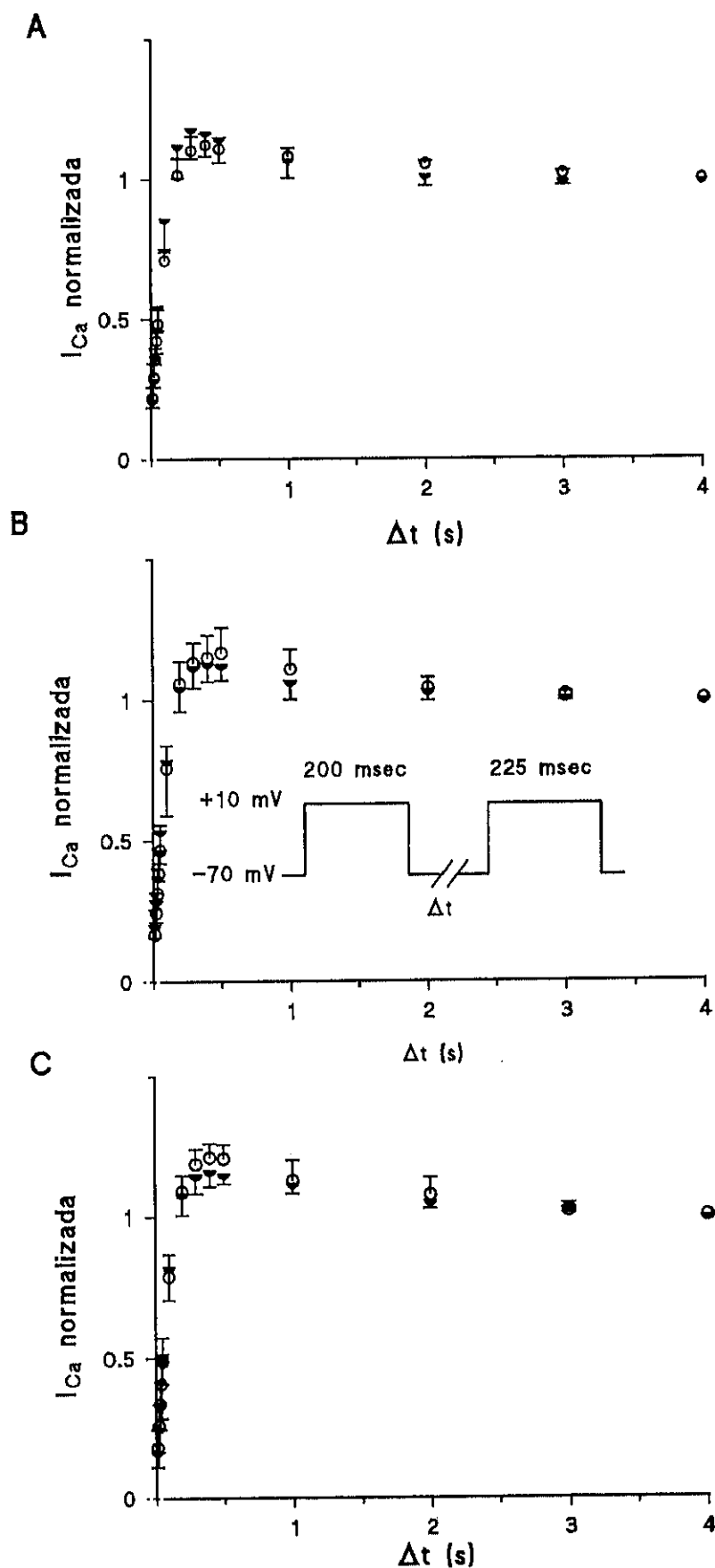
#### 4.2.4.- CINÉTICA DEPENDIENTE DEL TIEMPO

##### 4.2.4.1.- *Reactivación*

El análisis del tiempo empleado para la recuperación de los canales de  $Ca^{2+}$ , tipo L, de la inactivación se analizó utilizando un protocolo de doble pulso. Desde un  $V_h$  de -70 mV, dos pulsos de 225 ms de duración a +10 mV se separaron por una vuelta al  $V_h$  durante un tiempo que varió de 0.1 a 4 s. La corriente registrada fue la correspondiente al segundo pulso de cada grupo de dos, y se normalizó dividiéndola entre la obtenida a los 4 s de intervalo y relacionándola en una gráfica, con respecto al intervalo entre los pulsos condicionante y test.

Los datos obtenidos en la reactivación de la  $I_{Ca}$  se representan en la figura 16. Todas las células presentaron el mismo patrón de reactivación, con un overshoot (cuando la corriente registrada, en respuesta al pulso test, es mayor que la obtenida en respuesta al pulso condicionante) entre 100 ms a 2 s. El tiempo de recuperación de la inactivación, al 50 %, se extrapoló de la gráfica para cada célula, y sus valores medios no fueron significativamente distintos entre grupos estudiados, (en ms):  $66.32 \pm 6.6$  (n=4) en ápex,  $71.1 \pm 9$  (n=7) en pared libre, y  $65.8 \pm 10.6$  (n=7) en septum, miocitos controles; y  $56.94 \pm 7.6$  en ápex (n=7),  $60.3 \pm 6.1$  en la pared libre (n=9), y  $60.8 \pm 7.8$  en septum (n=8) miocitos hipertróficos





**Fig. 16:** Reactivación de la  $I_{Ca}$  en función del tiempo. Panel A, células de ápex; B, de pared libre; y C, de septum. Los símbolos blancos indican células aisladas de corazones controles y los negros de corazones hipertroficados. Las líneas verticales indican las DSM.

#### 4.2.4.2.- *Cursos temporales de activación e inactivación*

En cada trazo de  $I_{Ca}$ , se midió el tiempo desde el comienzo del pulso hasta el pico máximo de corriente (tiempo al pico) y la cinética de caída de corriente por el ajuste del trazo (desde el pico hasta el final del pulso) a una función matemática con el programa Clampfit, Axon Instruments. La mejor correlación se obtuvo con una ecuación biexponencial, con dos constantes de tiempo, una rápida y otra lenta:

$$I_t = A_r \exp (-t/\tau_r) + A_s \exp (-t/\tau_s) + A_c$$

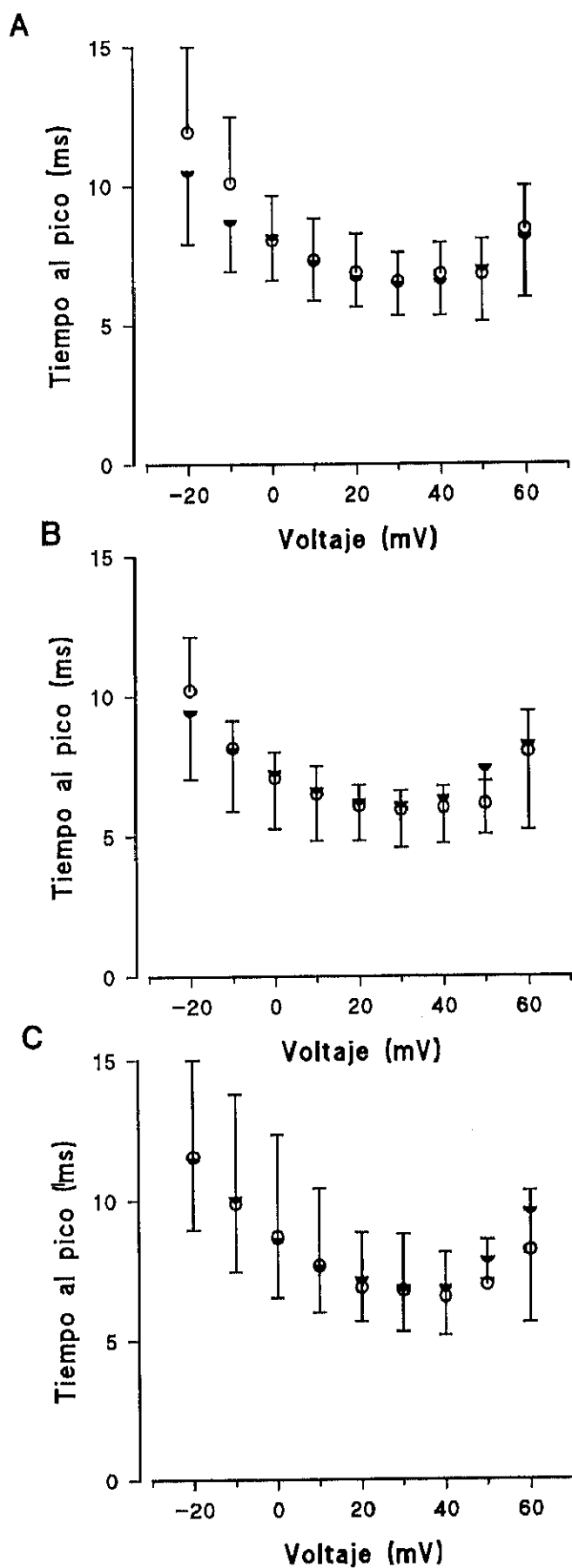
donde  $I_t$  es la amplitud total de la corriente de entrada.;  $A_r$ ,  $A_s$  son las amplitudes de los componentes rápido y lento;  $A_c$  es el componente independiente del tiempo; y  $\tau_r$  y  $\tau_s$  las constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente.

##### *Curso temporal de activación*

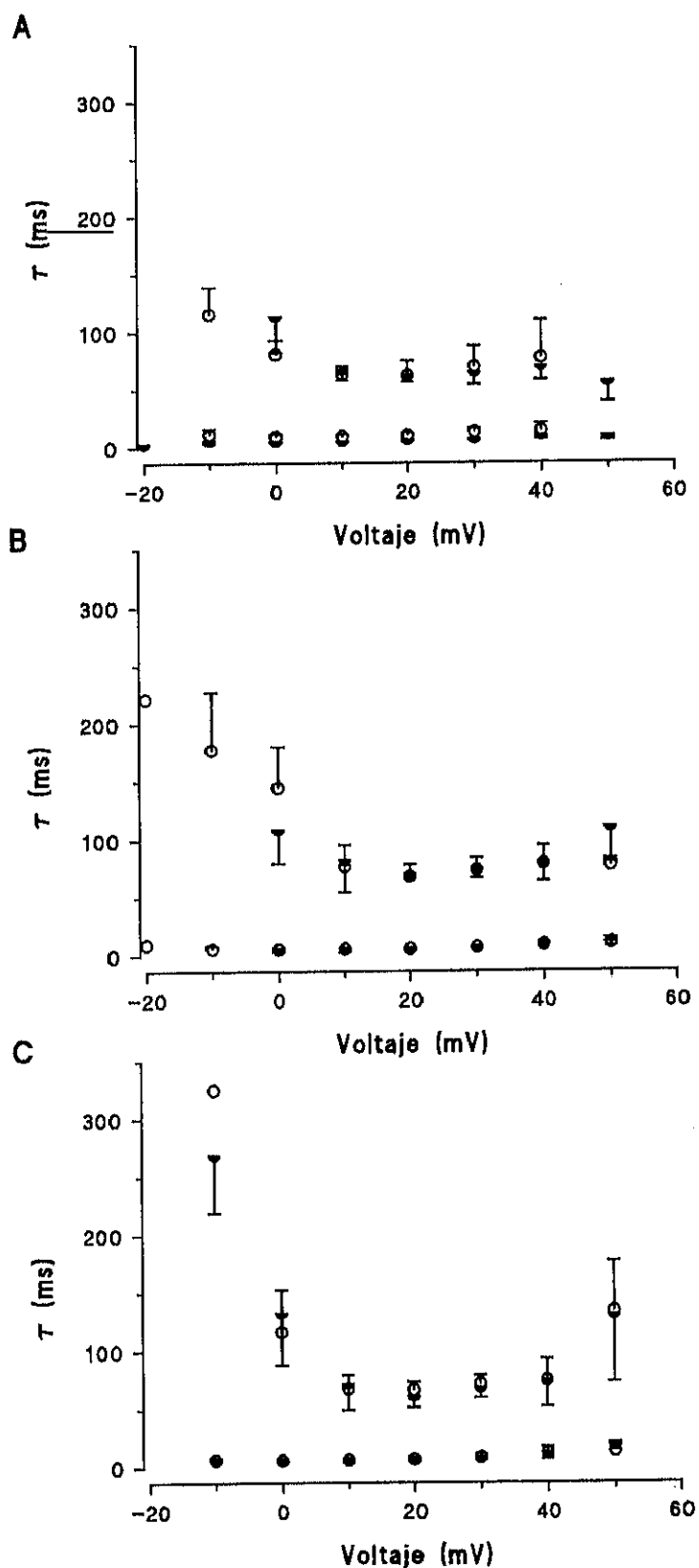
El tiempo de activación fue rápido (fig 17). Los valores medios de tiempo al pico de corriente, al potencial de +10 mV (potencial al cual se registró la máxima  $I_{Ca}$ ) fue, en ms:  $7.3 \pm 1.5$ ,  $6.5 \pm 1$ , y  $7.7 \pm 2.7$  en ápex (n=9), pared libre izquierda (n=8), y septum (n=9), respectivamente, miocitos aislados de corazones controles; y  $7.32 \pm 1.4$  en ápex (n=12),  $6.7 \pm 1.9$  en pared libre (n=13), y  $7.7 \pm 1.7$  en septum (n=10), células aisladas de corazones hipertróficos. No hubo diferencia significativa entre grupos.

##### *Curso temporal de inactivación*

Después de la rápida activación, la  $I_{Ca}$  mostró una inactivación que fue inicialmente rápida, seguida de una caída más lenta hacia la línea de corriente cero. Las dos constantes de tiempo (rápida y lenta) de inactivación, están representadas, en función del potencial, en la figura 18. Tampoco se observó ninguna diferencia significativa en la inactivación dependiente del tiempo, ni entre células procedentes de distinta topografía, ni entre células controles e hipertróficas. Los trazos de corriente máxima en cada célula presentaron una



**Fig. 17:** Tiempo al pico de máxima corriente de la  $I_{Ca}$  en células de ápex (A), pared libre (B) y septum (C). Los círculos blancos indican los valores medios obtenidos en células controles y los semicírculos en células hipertróficas, las líneas verticales indican DSM.



**Fig. 18:** Constantes de inactivación de la  $I_{Ca}$  en células de ápex (A), pared libre (B) y septum (C) de corazones controles (círculos blancos) e hipertróficos (semicírculos negros). Las líneas verticales son las DSM.

constante rápida de inactivación (en ms) de  $5.9 \pm 1.9$  en ápex ( $n=9$ ),  $5.8 \pm 1$  en la pared libre ( $n=8$ ), y  $6.2 \pm 1.6$  en septum ( $n=9$ ) aislados de corazones controles. En los corazones hipertróficos, las constantes rápidas fueron de  $6.2 \pm 1.5$  ms,  $7.0 \pm 1.2$  ms, y  $6.9 \pm 2.5$  ms en células hipertróficas de ápex ( $n=12$ ), pared libre ( $n=13$ ) y septum ( $n=10$ ) respectivamente. Las constantes lentas de inactivación fueron,  $63.1 \pm 7$  *versus*  $67.9 \pm 3$  ms en ápex,  $77.0 \pm 18$  *versus*  $83.2 \pm 8.2$  ms en la pared libre, y  $67.7 \pm 11.9$  *versus*  $83.2 \pm 8.2$  ms en septum de corazones controles *versus* hipertróficos.

#### 4.2.5.- SÍNTESIS

La corriente lenta de entrada de calcio no es homogénea en las células ventriculares de rata. Sin embargo, esta variabilidad no está relacionada con la procedencia regional de las mismas. Es posible que este hecho sea responsable de la variabilidad encontrada en las duraciones de los potenciales de acción dentro de cada parte estudiada, pero no es la causa de la diferencia en las DPAs observada entre distintas localizaciones.

La densidad de  $I_{Ca}$  no resulta modificada con el proceso de hipertrofia, por lo que esta corriente no es la responsable de la prolongación del potencial de acción durante hipertrofia cardíaca.

Puesto que aún no hemos resuelto el problema de cual es la corriente implicada en la heterogeneidad encontrada en los corazones normales ni en la prolongación en la duración del potencial de acción de las células hipertróficas del ápex y la pared libre, continuaremos nuestro estudio, esta vez con la corriente transitoria de salida de potasio,  $I_{to}$ , la cual se ha sugerido que sea la causante de la heterogeneidad en situación control (Furukawa y cols., 1990a; Antzelevitch y cols., 1991).

#### 4.3.- ESTUDIO DE LA CORRIENTE TRANSITORIA DE SALIDA DE POTASIO SENSIBLE A LA 4-AMINOPIRIDINA

##### 4.3.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Para realizar el estudio de la corriente transitoria de salida, se operaron catorce ratas Sprague-Dawley (180-200 g). En la mitad de ellas se indujo hipertrofia ventricular izquierda, por medio de la colocación de un clip en la aorta abdominal. La otra mitad sufrió una operación simulada, que fue en todo idéntica a la anterior excepto en que no se le colocó ningún clip. Este segundo grupo fue utilizado como control.

Al tiempo de los experimentos, los pesos de los animales controles y los que habían sufrido constricción aórtica, no fueron diferentes. Por el contrario, los corazones de las ratas con constricción aórtica fueron significativamente mayores que los controles (ver tabla 12), lo que redundó en un mayor ratio peso corazón/peso corporal en el grupo de los animales con constricción aórtica ( $5.5 \pm 0.6$  mg/g en las ratas controles, frente a  $3.7 \pm 0.3$  mg/Kg en las hipertróficas). Ésto supone un incremento de un 48% aproximadamente, por lo que los corazones de los animales con constricción aórtica fueron considerados hipertróficos.

**Tabla 12:** Características de las ratas controles e hipertróficas.

	Peso corporal (g)	Peso corazón (g)	Ratio (mg/g) corazón/cuerpo
Control (n=7)	$427.7 \pm 36.5$	$1.6 \pm 0.2$	$3.7 \pm 0.3$
Hipertrofia (n=6)	$442.7 \pm 35.1$	* $2.4 \pm 0.3$	* $5.5 \pm 0.6$

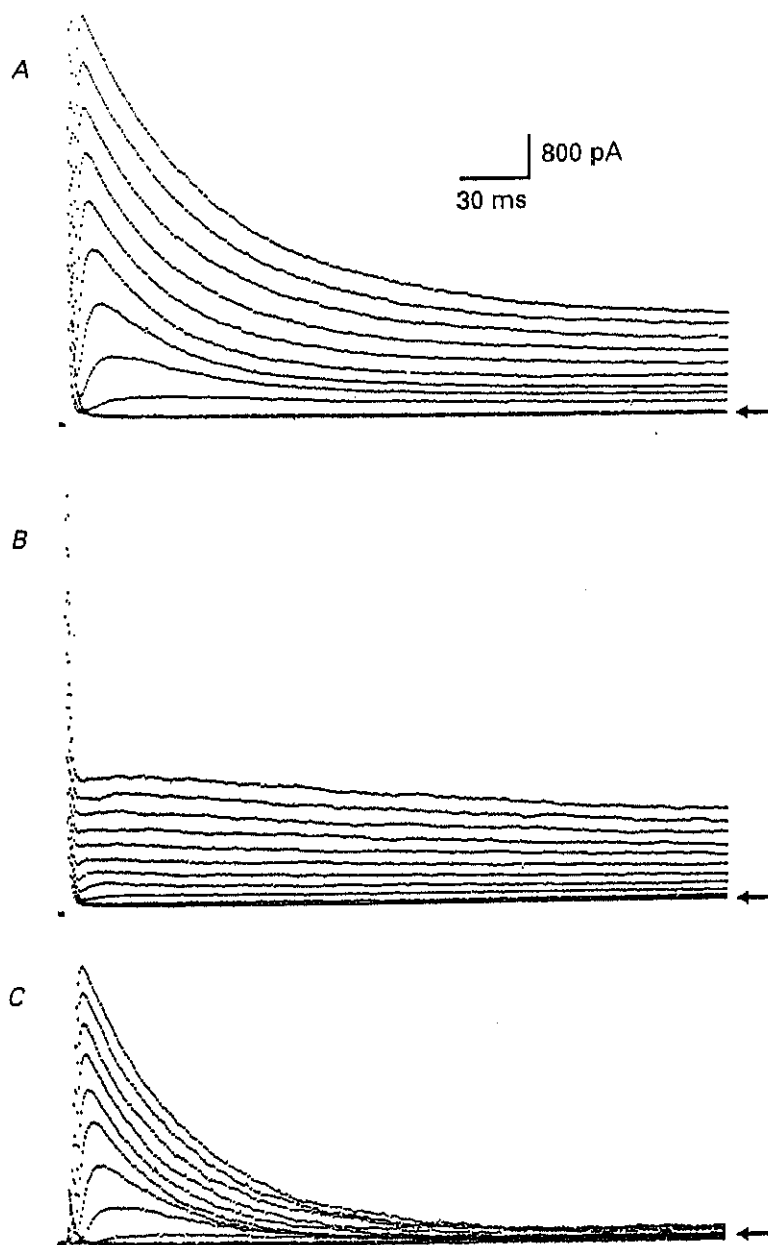
Los datos están expresados como medias  $\pm$  DSM. \*,  $p < 0.001$

#### 4.3.2.- CORRIENTE TRANSITORIA DE SALIDA

Basando nuestro diseño experimental en la existencia de una relativamente grande  $I_{to}$  en rata (Josephson y cols., 1984), y la heterogeneidad de los potenciales de acción, encontrada en las células ventriculares de esta especie (Watanabe y cols., 1983), decidimos estudiar dicha corriente, en células ventriculares de rata de tres regiones anatómicas distintas: apex, septum interventricular y pared libre izquierda.

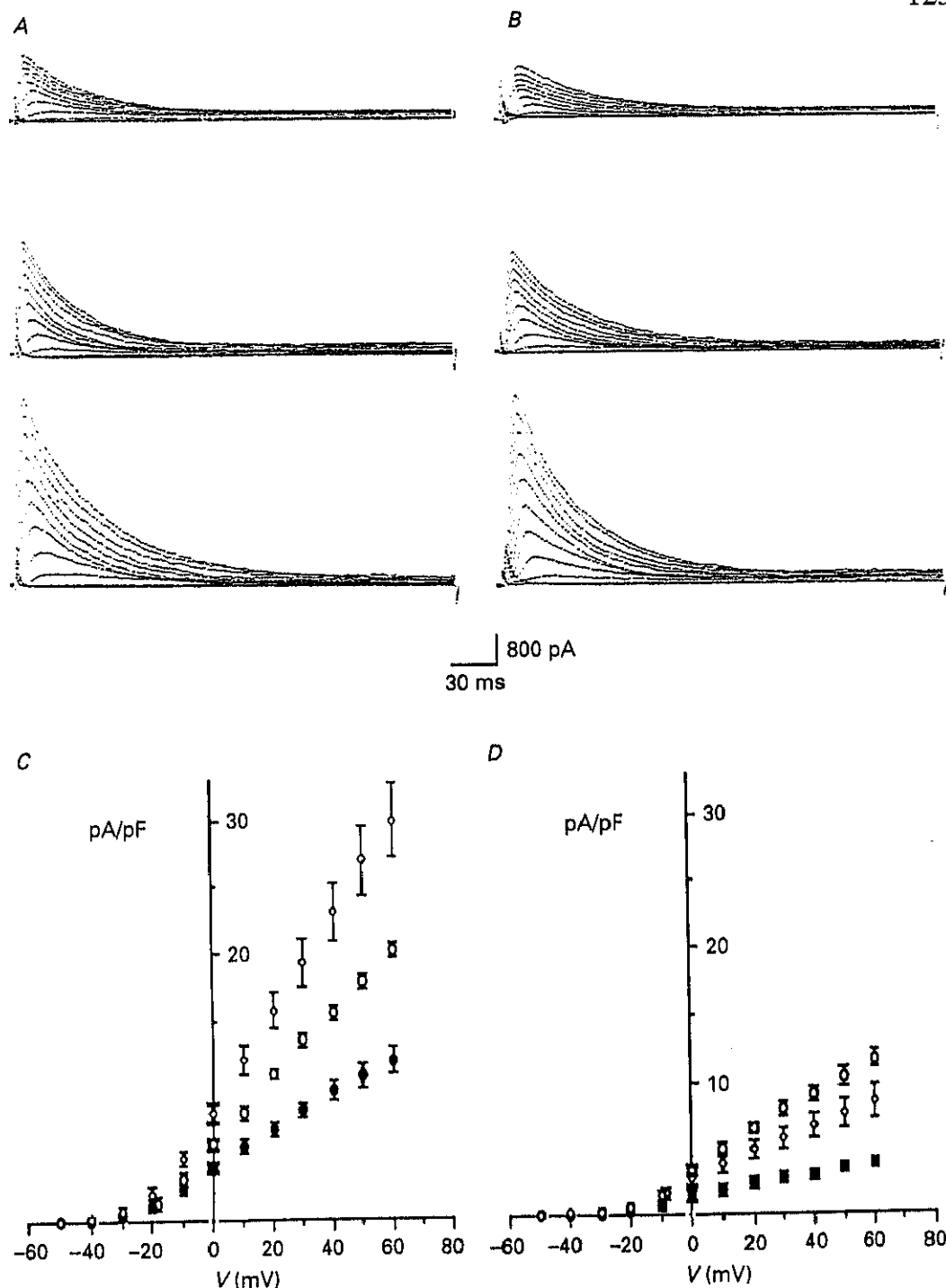
Para estudiar esta corriente, las células fueron sometidas a distintos pulsos despolarizantes, desde un potencial de fijación,  $V_h$ , de -80 mV (cercano al potencial de reposo) que fueron desde -50 mV hasta +60 mV, en incrementos de +10 mV. La duración de los pulsos fue de 300 ms y el intervalo de 5 s.

En células normales, los pulsos positivos a -30 mV indujeron una corriente de salida dependiente del tiempo y el voltaje. Esta corriente se activó rápidamente, hasta llegar a un pico máximo seguido de una más lenta inactivación para llegar a un "plato" del modo descrito por Josephson y cols. (1984). Para asegurarnos de la naturaleza iónica de esta corriente, añadimos al líquido de perfusión 4-aminopiridina (4-AP) (ver sección soluciones en métodos), que es un bloqueante de la  $I_{to}$ , y repetimos el mismo protocolo. Después hicimos la sustracción de los dos registros (antes y después de la perfusión con 4-AP). De esta forma estudiamos la  $I_{to}$  como la corriente sensible a 4-AP evitando la contaminación con otras corrientes (fig 19). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Apkon y Nerbonne (1991). La contaminación con la corriente lenta de entrada de calcio,  $I_{Ca}$ , se evitó con la presencia de 2 mM de  $CoCl_2$ . No observamos el segundo componente de la corriente transitoria de salida en nuestros experimentos puesto que este componente depende del aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular. En nuestro protocolo se evitó el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, y de este modo el segundo componente de la corriente transitoria de salida, por dos vías: 1) evitando la entrada de calcio procedente del medio externo añadiendo  $Cl_2Co$  que bloquea los canales de calcio y 2) quelando el que se pudiera liberar de reservorios como el retículo sarcoplásmico mediante la adición de EGTA a la solución interna (ver soluciones en métodos).



**Fig. 19:** **A**, corriente transitoria total registrada en un miocito normal en respuesta a despolarizaciones desde un potencial de -80 mV a distintos potenciales que variaron desde -50 mV hasta +60 mV, en incrementos de 10 mV. La solución externa contenía 2 mM de  $\text{Co}^{2+}$  y colina reemplazando al sodio. **B**, corrientes registradas en la misma célula en presencia de 4-AP. **C**, Corriente transitoria sensible a la 4-AP, obtenida por sustracción de los registros anteriores. Las flechas indican el nivel de corriente cero.





**Fig. 20:** Registros representativos de la  $I_o$  obtenidos en células controles (A) e hipertróficas (B), de septum (trazos superiores), ápex (centro) y pared libre (trazos inferiores). C, representación de la densidad de corriente frente al voltaje en células aisladas de corazones controles (C), o hipertróficos (D) procedentes de ápex (rombos blancos) pared libre izquierda (círculos blancos) y septum (puntos negros). V, voltaje. Los símbolos indican medias y las barras verticales ESM.

Todos los análisis fueron hechos sobre la corriente sensible a 4-AP agrupando las células según su procedencia regional: apex, pared libre izquierda y septum. Para poder comparar las corrientes de células de diferente tamaño, la amplitud de corriente en cada célula fue normalizada por su capacitancia de membrana  $C_m$ , la cual está en relación con la superficie ( $1 \mu\text{F}/\text{cm}$ , Kleiman y Houser, 1988) y es más exacta que la medición a través del microscopio, que despreciaría las invaginaciones de la membrana. De esta manera, siempre nos referiremos a la corriente en términos de densidad.

#### 4.3.2.1.- $I_o$ en células controles

En la figura 20, se muestran los registros de la corriente transitoria de salida sensible a 4-AP en una célula de cada región estudiada. Se han elegido células de similar  $C_m$ . Como se ve, en septum la  $I_o$  es menor que en apex, y en apex menor que en la pared libre izquierda, a pesar de que ni la dependencia del voltaje, ni el umbral de activación fueron distintos. La  $I_o$  se empieza a activar entre  $-45$  y  $-25$  mV (tabla 13) y a partir de ahí, la corriente comienza a aumentar, según el potencial de membrana va haciéndose más positivo. Para potenciales mayores a  $0$  mV las densidades de  $I_o$  se diferencian claramente según la procedencia regional de los miocitos siguiendo el patrón: pared libre izquierda  $>$  apex  $>$  septum (ver tabla 13). Puesto que no hubo diferencias en las capacitancias entre grupos, no se puede relacionar la diferencia de densidades con diferente morfología celular.

Estos hallazgos indican que la corriente transitoria de salida en miocitos ventriculares de rata es sensible a la 4-AP y dependiente del tiempo y el voltaje como previamente describieron otros autores (Josephson y cols., 1984; Dukes y cols., 1991; y Apkon y cols., 1991). Además, se ve que existe una relación entre la procedencia topográfica de la célula y algunas de las características de la corriente transitoria de salida.

#### 4.3.2.2.- $I_o$ en células hipertróficas

Para estudiar la posible modulación de la hipertrofia sobre la corriente transitoria, se hizo el mismo protocolo con los miocitos procedentes de corazones hipertróficos.

La media de la amplitud de  $I_{to}$  fue sólo ligeramente inferior en las células ventriculares hipertrofiadas (tabla 13 y fig 20), pero las densidades resultaron claramente disminuidas en la hipertrofia cardíaca. Al igual que en células normales, se vio una diferencia regional en la  $I_{to}$ , que de mayor a menor fue: apex > pared libre > septum. Sin embargo, las diferencias entre grupos fueron menos marcadas que en situación control. Los umbrales de activación sufrieron un desplazamiento hacia potenciales más positivos (tabla 13). La diferencia en la corriente transitoria sensible a 4-AP, entre grupos estudiados (ya sea por distinta topografía o situación control o hipertrofia), podría estar relacionada con un cambio en la densidad de canales o en las propiedades de los mismos. Por ello, nos propusimos estudiar otras características de la corriente.

**Tabla 13:** Características de la corriente transitoria de salida de potasio, sensible a 4-AP, en células aisladas de diferentes regiones topográficas de corazones controles e hipertróficos.

		$C_m$ (pF)	$V_u$ (mV)	$I_{to}$ (pA/pF) [+60 mV]
APEX	C [n=10]	$159.8 \pm 52.1$	$-34.0 \pm 5.7$	$20.2 \pm 1.7$
	H [n=10]	$242.7 \pm 57.9$	$-27.5 \pm 10.6$	$11.6 \pm 2.0$
PARED LIBRE IZQ	C [n=12]	$142.6 \pm 45.1$	$-35.0 \pm 7.4$	$30.1 \pm 9.2$
	H [n=16]	$282.7 \pm 46.5$	$-21.7 \pm 6.5$	$8.4 \pm 5.0$
SEPTUM	C [n=12]	$177.4 \pm 26.1$	$-31.7 \pm 6.5$	$11.9 \pm 3.3$
	H [n=16]	$277.6 \pm 44.4$	$-26.9 \pm 6.5$	$3.8 \pm 1.5$

$C_m$ , capacitancia de membrana; C, miocitos procedentes de corazones controles; H, miocitos aislados de corazones hipertróficos;  $V_u$ , voltaje umbral, al cual se empieza activar la corriente transitoria de salida,  $I_{to}$ . En la tabla se dan los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de densidad de  $I_{to}$  están medidos a +60 mV. Los valores expresan medias  $\pm$  DSM.

### 4.3.3.- CINÉTICA DE $I_{to}$ DEPENDIENTE DEL VOLTAJE

#### 4.3.3.1.- *Activación en estado estacionario*

Para calcularla, se determinó la conductancia de cuerda en función del potencial de membrana según Lefevre y cols. (1991):

$$G = I / (V_m - V_{rev})$$

donde  $G$  es la conductancia de cuerda calculada al potencial de membrana  $V_m$ ,  $I$  es la amplitud de la corriente medida al potencial  $V_m$ , y  $V_{rev}$  es el potencial de reversión aparente de la corriente, asumiendo que es una corriente pura de potasio, calculamos el potencial de equilibrio para este ión, según la ecuación de Nerst. En nuestras condiciones experimentales fue aproximadamente -94 mV. Como el valor máximo de  $I_{to}$  registrado no refleja la conductancia máxima, la determinamos según la regresión de los puntos a una ecuación de Boltzman:

$$G = G_{max} / \{1 + \exp [(V_{0.5} - V_m) / K]\}$$

donde  $G$  es la conductancia calculada al potencial de membrana  $V_m$ ,  $V_{0.5}$  es el potencial al cual la activación es la mitad de la máxima, y  $K$  es la pendiente de la curva de activación en relación al voltaje. Utilizando el valor de conductancia máxima calculada por este método, representamos gráficamente la conductancia normalizada  $G / G_{max}$  frente al voltaje (fig 21). Puesto que el potencial de reversión es un valor aproximado, las curvas de activación obtenidas se deben considerar como una aproximación. No se observó diferencia en la cinética de activación en las distintas localizaciones estudiadas (tabla 14). Sin embargo, las conductancias máximas consideradas en densidad fueron distintas según la topografía (PL > A > S), y claramente menor en las células procedentes de corazones hipertróficos. Esta diferencia podría ser debida a los valores mayores de capacitancias observados en células hipertróficas. Si comparamos las conductancias máximas, antes de normalizarlas a sus respectivas capacitancias, no observamos diferencias excepto para S, siendo las hipertróficas versus normales (en  $\mu S$ ):  $17.9 \pm 6.8$  versus  $18.6 \pm 7.8$  en A;  $15.8 \pm 10.5$  versus  $26.0 \pm 13.0$  en PL; y  $6.7 \pm 2.9$  versus  $13.8$  en S. Asumiendo que  $G_{max}$  está relacionada con el número de canales funcionales, consideramos que existe una gran probabilidad de que el número de canales funcionales por célula (procedente de A o PL)

no se encuentre modificado en los corazones hipertróficos pero en densidad se encuentre disminuida a consecuencia de que la célula tiene mayor superficie, pero no se han sintetizado nuevos canales. Sin embargo, esta hipótesis no sería válida en el caso de S, en el que la hipertrofia induciría una disminución en el número de canales funcionales.

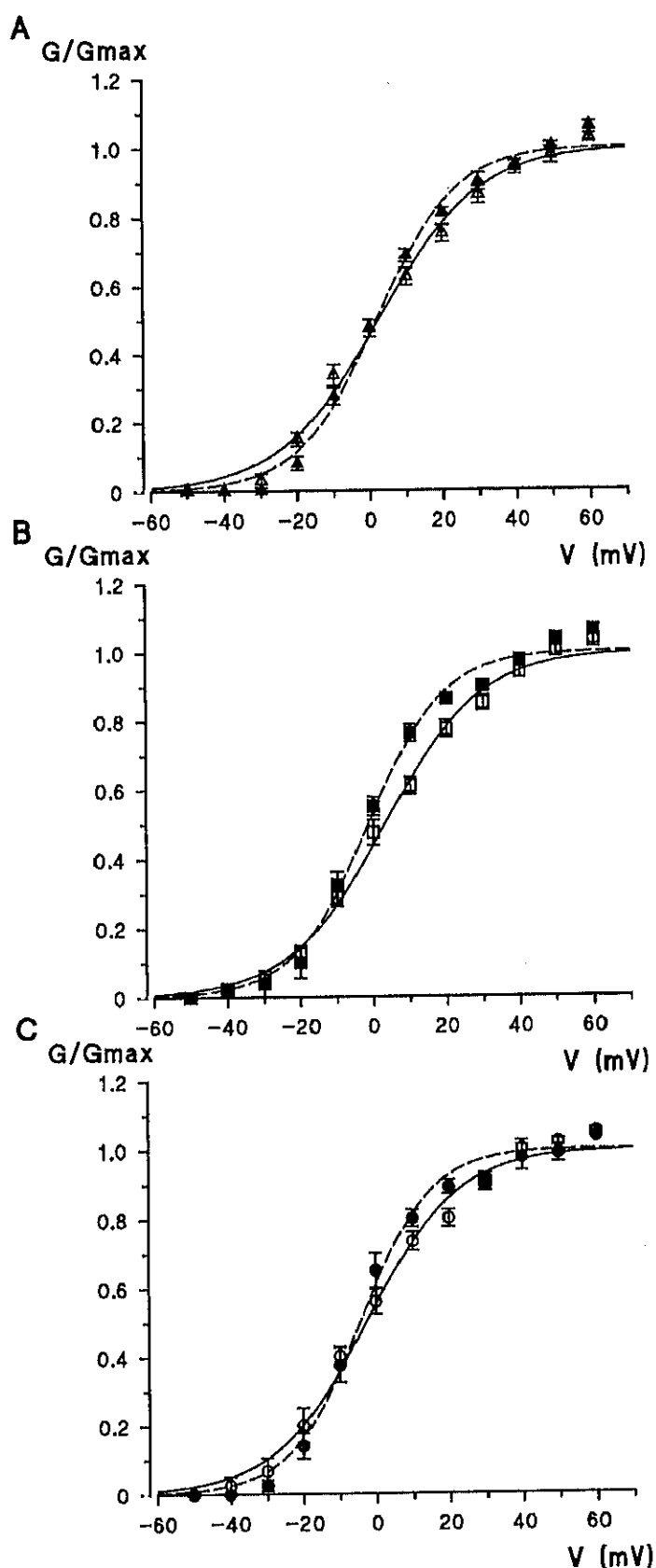
**Tabla 14:** Parámetros de la curva de activación en estado estacionario de la  $I_{to}$  en miocitos aislados de distintas partes del ventrículo izquierdo de corazones controles e hipertróficos.

		$G_{max}(\mu S/pF)$	$V_{0.5} (mV)$	$K(mV)$
<b>APEX</b>	C [n=9]	$0.13 \pm 0.02$	$3.5 \pm 4.6$	$12.0 \pm 2.6$
	H [n=10]	$0.07 \pm 0.01$	$2.5 \pm 3.5$	$11.3 \pm 1.5$
<b>PARED LIBRE</b>	C [n=11]	$0.18 \pm 0.07$	$4.1 \pm 5.6$	$13.8 \pm 4.7$
	H [n=16]	$0.05 \pm 0.03$	$-1.6 \pm 7.2$	$10.0 \pm 2.2$
<b>SEPTUM</b>	C [n=12]	$0.08 \pm 0.02$	$-2.4 \pm 8.6$	$12.3 \pm 3.2$
	H [n=16]	$0.02 \pm 0.01$	$-3.7 \pm 7.5$	$8.7 \pm 2.6$

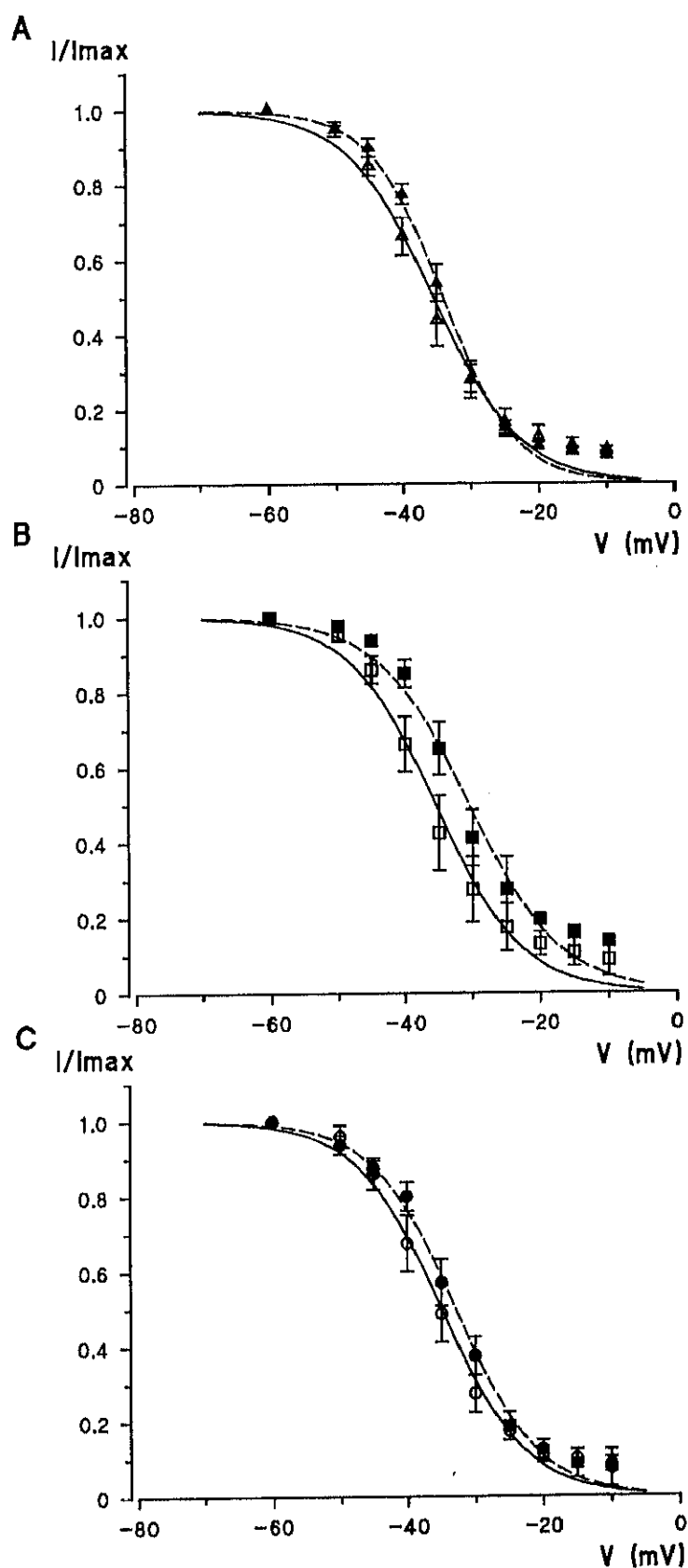
C, Células controles; H, células hipertróficas;  $G_{max}$ , conductancia máxima normalizada a la capacitancia de membrana;  $V_{0.5}$ , voltaje al cual la activación es la mitad de la máxima; K, pendiente de la curva de activación en su punto de inflexión. los datos expresan medias  $\pm$  DSM.

#### 4.3.3.2.- Inactivación en estado estacionario

Para determinar la dependencia del voltaje de la inactivación en estado estacionario de  $I_{to}$ , sometimos a la célula a un pulso condicionante, de 2 s de duración (0.2 Hz), a distintos potenciales que variaron desde -60 mV hasta -10 mV, con incrementos de +5 mV, desde un potencial ( $V_h$ ) de -80 mV. Cada pulso condicionante fue seguido de una vuelta al  $V_h$  durante 3 ms, para permitir mejor resolución de la corriente capacitativa, antes del pulso test a +40 mV de 700 ms de duración. Las corrientes registradas en respuesta a los pulsos test, fueron normalizadas, dividiéndolas entre la corriente máxima obtenida en cada célula.



**Fig. 21:** Curvas de activación en estado estacionario de células controles (símbolos blancos) e hipertróficas (negros), de células procedentes del ápex (A), pared libre (B) y septum (C). Las líneas continuas representan la curva de Boltzmann (ver texto) que mejor se ajusta a los puntos para células controles, y las discontinuas para hipertróficas. Las barras verticales expresan  $\pm$  ESM.



**Fig. 22:** Curvas de inactivación en estado estacionario de células controles (símbolos blancos) e hipertróficas (negros), de células procedentes de ápex (A), pared libre (B) y septum (C). Las líneas continuas representan la curva de Boltzmann (ver texto) que mejor se ajusta a los puntos obtenidos en las células controles, y las discontinuas en las hipertróficas. Las barras verticales expresan  $\pm$  ESM.

De esta manera, la dependencia de la inactivación pudo ser ajustada a una distribución de Boltzmann de la siguiente forma:

$$I/I_{\max} = 1/\{1+\exp[(V_{0.5}-V_c)/k]\}$$

donde  $V_{0.5}$  es el potencial al cual la inactivación es la mitad de la máxima,  $V_c$  es el potencial del pulso condicionante, y  $k$  es la pendiente de la curva en el punto de inflexión.

La curva de inactivación de  $I_{to}$  tuvo forma sigmoidal (fig. 22). La inactivación fue completa a potenciales entre -10 y +10 mV, y al llegar a potenciales de -50 mV, la inactivación fue casi completamente ausente. Las tres curvas de inactivación (en cada región anatómica estudiada) fueron casi idénticas, lo que sugiere la falta de modulación de la inactivación según la topografía. No se observaron diferencias significativas ni en la  $V_{0.5}$ , ni en la  $k$ , entre las distintas regiones anatómicas estudiadas ni en situación control, ni en hipertrofia (tabla 15).

**Tabla 15:** Parámetros de las curvas de inactivación en estado estacionario de la  $I_{to}$  en células procedentes de ventrículos izquierdos controles o hipertróficos.

		$V_{0.5}$ (mV)	$k$ (mV)
<b>APEX</b>	C [n=7]	$-36.1 \pm 3.8$	$-5.9 \pm 0.6$
	H [n=8]	$-34.5 \pm 2.5$	$-5.3 \pm 1.0$
<b>PARED LIBRE</b>	C [n=6]	$-36.0 \pm 5.8$	$-5.9 \pm 1.1$
	H [n=10]	$-31.2 \pm 6.5$	$-5.4 \pm 1.1$
<b>SEPTUM</b>	C [n=7]	$-35.7 \pm 4.7$	$-5.5 \pm 0.5$
	H [n=7]	$-33.7 \pm 3.5$	$-6.3 \pm 1.3$

Valores del voltaje al cual la inactivación es la mitad de la máxima ( $V_{0.5}$ ), y de la pendiente de la curva de inactivación ( $k$ ), de la  $I_{to}$  en células controles (C), e hipertróficas (H), expresados como media  $\pm$  DSM.



#### 4.3.4.- CINÉTICA DE $I_{to}$ DEPENDIENTE DEL TIEMPO

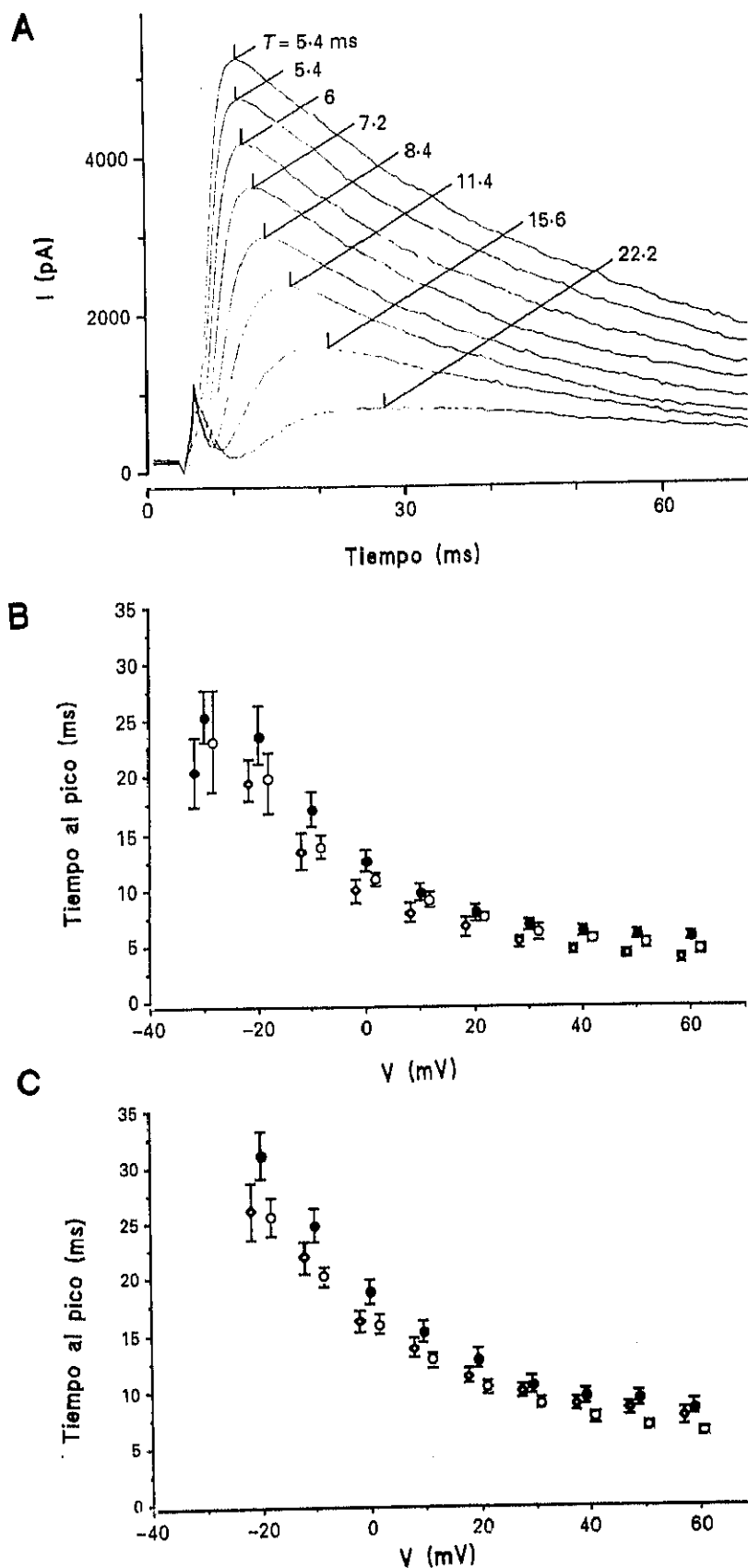
En los trazos de la corriente (fig. 19 y 20), se puede observar que, durante el pulso despolarizante, la  $I_{to}$  aumenta rápidamente hasta alcanzar un pico máximo, y luego declina más suavemente, mostrando una dependencia del tiempo. Los tiempos de activación e inactivación fueron analizados midiendo el tiempo al pico, desde que comenzó el pulso despolarizante, y el análisis de la caída de la corriente sensible a 4-AP.

##### 4.3.4.1.- *Curso temporal de activación*

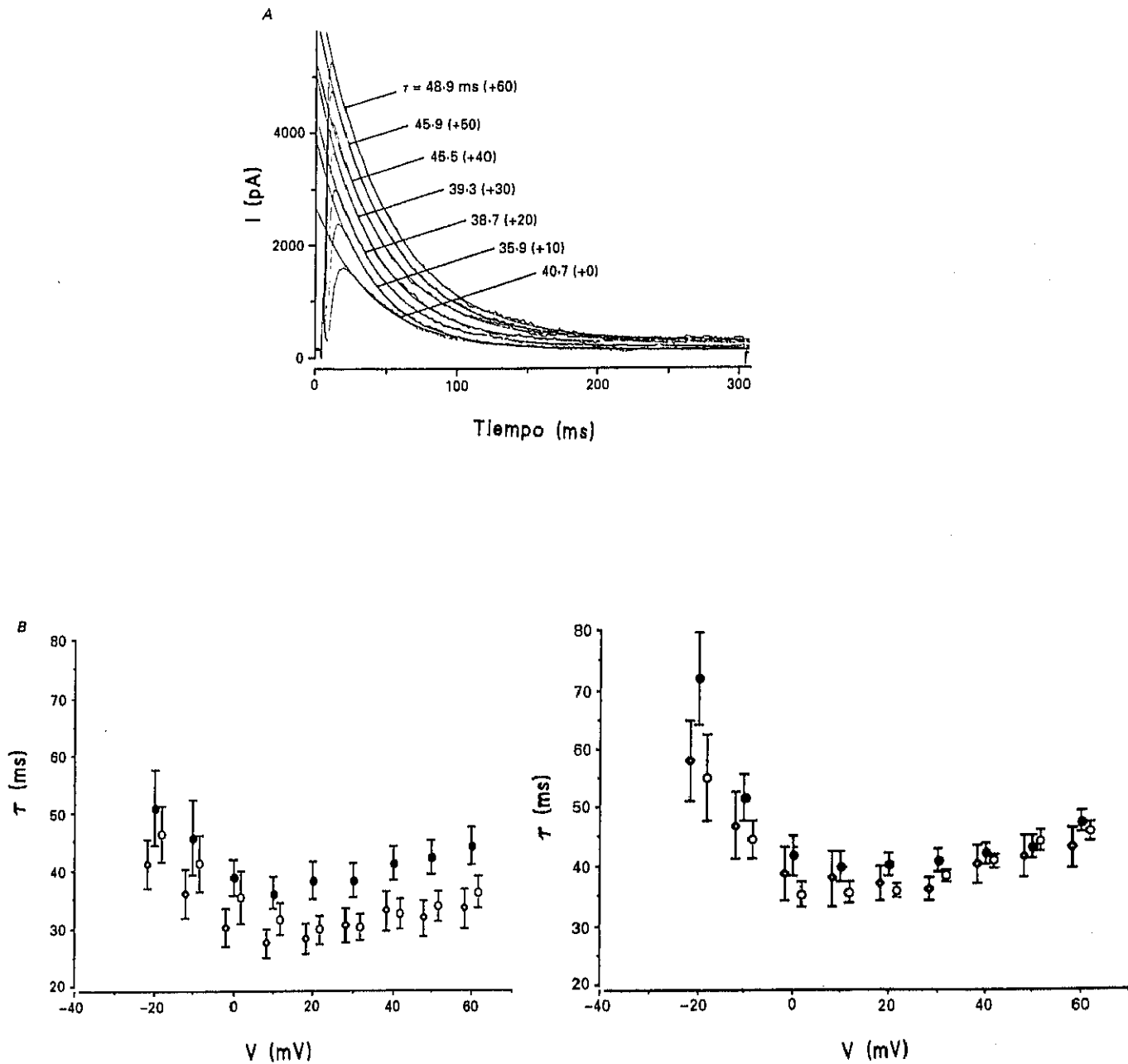
Como se muestra en la figura 23 A, el tiempo al pico fue medido desde el comienzo del trazo ascendente hasta el máximo valor de  $I_{to}$ . A voltajes cercanos al umbral de activación (-30 mV), el tiempo al pico fue menor de 45 ms y se fue acortando a potenciales más positivos (fig 23 B y C).

Debido a problemas metodológicos, como el hecho de realizar los registros a temperatura ambiente, no podemos descartar una sobreestimación de los valores obtenidos. sin embargo, esta dependencia del voltaje del tiempo al pico, también ha sido medida por Josephson y cols. (1984), y confirmada por Apkon y Nerbone (1991) calculando la constante de activación haciendo la regresión de la fase ascendente del registro a una ecuación monoexponencial. sin embargo, ellos analizaron la  $I_{to}$  total, sin hacer la diferenciación con la corriente sensible a 4-AP.

No se encontró diferencia apreciable entre las distintas partes estudiadas, ni en control, ni en hipertrofia. Pero al comparar los resultados entre control e hipertrofia, se puede apreciar un alargamiento en el tiempo al pico en el caso de las células hipertróficas (fig 23).



**Fig. 23:** Cinética de activación de  $I_{0}$ . **A**, ejemplo de la medición del tiempo al pico de corriente a cada voltaje,  $T$ , tiempo al pico que fue medido desde el comienzo de ascenso de la corriente hasta el máximo valor de corriente en cada trazo. **B**, valores medios  $\pm$  ESM obtenidos en células controles y **C**, hipertróficas; de ápex (círculos blancos), pared libre (rombos blancos) y septum (círculos negros)



**Fig. 24:** Cinética de inactivación de  $I_{to}$ . **A**, ejemplo de la medición de las constantes de tiempo a cada voltaje (el voltaje se indica entre paréntesis). El valor de la constante de tiempo ( $\tau$ ) se obtuvo de la curva de caída de la corriente, ajustándolo a una función monoexponencial. **B**, valores medios  $\pm$  ESM obtenidos en células de ápex (círculos blancos), pared libre (rombos blancos) y septum (círculos negros) procedentes de corazones controles (izquierda) e hipertróficos (derecha).

#### 4.3.4.2.- *Curso temporal de inactivación*

Para potenciales más positivos a -20 mV, la cinética de caída de la corriente  $I_{to}$ , sensible a 4-AP, fue monoexponencial. Usando el programa Clampfit (Axon Instruments), la ecuación que se ajustó mejor a la parte descendente del trazo fue:

$$I_{tot} = A_r \exp (-t/\tau) + A_c$$

donde  $I_{tot}$  es la corriente total de salida,  $A_r$  es la amplitud inicial de la fase de inactivación,  $\tau$  es la constante de tiempo de inactivación, y  $A_c$  es la amplitud del componente independiente del tiempo.

En la fig. 24 se representan las medias de las constantes de inactivación, calculadas según se acaba de explicar. Los valores individuales variaron desde 81.1 hasta 15.7 ms. En el rango de potenciales analizado (-20 a +60 mV), las constantes de inactivación, representadas en función del voltaje, mostraron una tendencia a exhibir una forma de U. Como puede observarse en la gráfica, no hubo una clara diferenciación entre partes, aunque las constantes de tiempo correspondientes a las células del septum fueron mayores que las correspondientes al ápex y a la pared libre.

En los miocitos hipertróficos hubo mayor homogeneidad entre regiones, pero al comparar las  $\tau_{inc}$  de las células hipertróficas con las controles, las primeras fueron mayores (fig. 24). Las constantes de inactivación de los miocitos aislados de corazones hipertróficos fueron intermedias entre las de septum y las de apex-pared libre en situación control. Los valores medios de estas constantes, a +40 mV, fueron:  $40.8 \pm 4.0$  versus  $32.5 \pm 8.3$  en ápex,  $42.1 \pm 6.8$  versus  $39.2 \pm 11.8$  en la pared libre, y  $42.1 \pm 6.8$  versus  $41.2 \pm 9.7$  ms en septum, de células hipertróficas y controles respectivamente.

#### 4.3.5.- SÍNTESIS

En este grupo de experimentos hemos demostrado que en situación fisiológica, la  $I_{to}$  está distribuida de forma heterogénea en las distintas partes estudiadas, siendo los valores medios: pared libre > ápex > septum, encontrándose una gran variabilidad en la

pared libre. La menor  $I_{to}$  encontrada en las células aisladas de septum en comparación con la de ápex y pared libre, explicaría la razón por la cual estas células presentan mayor duración en el potencial de acción.

En los corazones hipertróficos, la  $I_{to}$  es más pequeña en densidad comparada con la registrada en corazones normales, y tiende a hacerse más homogénea, siendo: ápex > pared libre > septum. Ésto podría relacionarse con el aumento en la duración del potencial de acción en los miocitos hipertróficos, sin embargo no está del todo claro por qué en las células del septum interventricular de corazones hipertróficos no está aumentada la duración del potencial de acción, puesto que la  $I_{to}$  está disminuida. Por este motivo, consideramos muy interesante analizar, en la misma célula, la duración del potencial de acción y las dos corrientes principales implicadas en la repolarización del potencial de acción cardíaco en la rata, la  $I_{Ca}$  y la  $I_{to}$ .

#### 4.4.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN Y LAS CORRIENTES DE CALCIO Y TRANSITORIA EN CADA CÉLULA

Los resultados presentados hasta este momento muestran que el potencial de acción es diferente en células de distinta procedencia, lo que, según los resultados que hemos obtenido al estudiar la corriente transitoria de salida, estaría determinado por la diferente distribución regional de la  $I_{to}$ . Por otra parte, el estudio de la  $I_{Ca}$  nos ha indicado que esta corriente es muy variable, pero que esta variabilidad no está distribuida según las diferentes localizaciones que hemos estudiado, esto es, ápex, pared libre y septum. Es posible que esta variación sea la determinante de la gran variabilidad que hemos encontrado en la duración del potencial de acción, sobretudo en la pared libre (ver fig 12, en la sección 4.1). Además, hemos encontrado que la corriente de calcio no varía en la hipertrofia, pero la  $I_{to}$  está disminuida en todas las regiones estudiadas del corazón hipertrófico, incluido el septum, única parte donde el potencial de acción no resulta enlentecido en nuestras condiciones experimentales. Ésto nos hace suponer que la contribución de las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Ca}$  puede ser distinta en las células de distinta procedencia regional. Desgraciadamente, al comparar lo que pasa con cada parámetro (potencial de acción,  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$ ) estamos tratando grupos diferentes de células, es decir, queremos relacionar los datos obtenidos en grupos de células distintas de animales distintos, lo cual unido a la normal variabilidad, dificulta sacar conclusiones definitivas. Por este motivo, en este grupo de experimentos hemos querido conocer la contribución de la  $I_{Ca}$  y la  $I_{to}$  a la duración del potencial de acción, estudiando los tres parámetros en la misma célula. Para ello estudiamos las células del ápex, pared libre y septum de 4 corazones controles y 5 hipertróficos. En la cámara de perfusión montada en el microscopio invertido, colocamos una alícuota de la suspensión con las células, las cuales perfundimos con una solución normal con sodio para registrar los potenciales de acción (ver sección soluciones en métodos). Los potenciales de acción se registraron como en otras ocasiones (ver sección 4.1). Seguidamente, las células se perfundieron con una solución igual a la anterior excepto en que el NaCl había sido sustituido por una concentración equimolar de cloruro de colina, para eliminar la corriente de sodio. Una vez

que el sodio fue eliminado de la cámara donde se encontraban las células, registramos las corrientes en respuesta a pulsos despolarizantes, de 300 ms de duración, desde -50 mV hasta +60 mV, en incrementos de +10 mV, (el potencial de fijación fue -60 mV), con un intervalo entre pulsos de 10 s. El mismo protocolo se repitió en presencia de cobalto (para bloquear la corriente de calcio) y después se volvió a repetir en presencia de cobalto más 4-AP (para bloquear además de la corriente de calcio, la corriente transitoria de salida) (ver soluciones). En algunos experimentos se añadió primero la 4-AP y luego el  $\text{Co}^{2+}$  más 4-AP. La corriente  $I_{\text{Ca}}$  se estimó como la sensible a cobalto, y la  $I_{\text{to}}$ , como la sensible a 4-AP. Para analizar la relación entre los tres parámetros, se midió la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización, y el potencial correspondiente a estos niveles de repolarización, en cada célula. Éstas duraciones se relacionaron con las corrientes  $I_{\text{Ca}}$  e  $I_{\text{to}}$  a los potenciales más cercanos a los correspondientes al 20 % de repolarización del potencial de acción.

#### 4.4.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Para este grupo de experimentos se utilizaron miocitos procedentes de 4 ratas controles y 5 hipertróficas. Los pesos de las ratas controles ( $501 \pm 23.5$  g) no fueron significativamente diferentes de los pesos de las ratas con estenosis aórtica ( $493 \pm 49.8$  g). Sin embargo, sí hubo diferencias en los pesos de los corazones ( $1.8 \pm 0.04$  g, en el caso de corazones controles, y  $2.3 \pm 0.3$  g, en corazones hipertróficos) y los ratios ( $3.5 \pm 0.18$  y  $4.8 \pm 0.43$  mg/g, en control e hipertrofia, respectivamente).

#### 4.4.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN CÉLULAS CONTROLES

Las células procedentes del ápex mostraron una duración del potencial de acción más corta que septum, con valores intermedios para la pared libre, de acuerdo con los resultados obtenidos en anteriores grupos de experimentos (ver tabla 16). Las densidades de  $I_{\text{to}}$  fueron distintas en las distintas regiones anatómicas, siendo pared libre  $\geq$  ápex  $>$  septum, de acuerdo también con los resultados obtenidos en anteriores grupos de experimentos. De todas formas, los valores de las densidades de las corrientes

incluidos en las tablas 16 y 17 no se pueden comparar con los obtenidos en los experimentos anteriores porque el potencial de fijación fue distinto, y puesto que aquí estudiamos las corrientes correspondientes a distintos niveles de repolarización de cada potencial de acción, no siempre los datos de las corrientes están a los mismos potenciales test.

**Tabla 16:** Datos obtenidos en células controles

	<b>APEX</b> (n = 10)		<b>PARED LIBRE</b> (n = 11)		<b>SEPTUM</b> (n = 8)	
<b>Cm (pF)</b>	150.6 ± 13.3		178.45 ± 10.1		196.5 ± 20.6	
<b>PR (mV)</b>	-74.8 ± 1.4		-74.75 ± 0.5		-69.125 ± 1.95	
<b>Repol.</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>
<b>DPA (ms)</b>	3.28 ± 0.4	14.21 ± 2.1	8.74 ± 2.4	34.64 ± 9.5	89.4 ± 20.5	157.1 ± 27.5
<b>I<sub>Ca</sub>/Cm</b> (pA/pF)	-6.18 ± 0.98	-1.95 ± 0.35	-9.46 ± 0.66	-3.22 ± 0.72	-8.43 ± 1.02	-2.89 ± 1.04
<b>I<sub>to</sub>/Cm</b> (pA/pF)	7.6 ± 0.53	2.6 ± 0.48	8.09 ± 1.88	2.58 ± 0.52	2.38 ± 0.39	1.08 ± 0.26

**Cm**, capacitancia de membrana; **PR**, potencial de reposo; **DPA**, duración del potencial de acción medido al 20% y 50% de repolarización; **Repol.**, repolarización; **I<sub>Ca</sub>/Cm**, densidad de la corriente de calcio; **I<sub>to</sub>/Cm**, densidad de la corriente transitoria de salida de potasio. **I<sub>Ca</sub>** e **I<sub>to</sub>** fueron medidas al potencial correspondiente al 20% y 50% de repolarización del potencial de acción en cada células. Los valores expresan medias ± ESM.

Al representar gráficamente las duraciones del potencial de acción al 20 % de repolarización, frente a las densidades de **I<sub>Ca</sub>** e **I<sub>to</sub>** registradas en la pared libre, se observó una distribución similar a la exponencial (fig 25, A), por lo que se representó el logaritmo decimal de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización en abscisas, y la



densidad de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  en ordenadas (fig 25, C). Para la  $I_{Ca}$  los puntos se ajustaron a una línea ( $p < 0.02$ ) de la forma:

$$y = -4.3 x - 3.24$$

y para la  $I_{to}$ , la regresión lineal indicó que la ecuación de la recta que mejor se ajustaba a los puntos ( $p < 0.01$ ), era de la forma:

$$y = -4.1 x + 8.5$$

Las corrientes  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  se solapan a ciertos potenciales, por lo que podría existir una relación entre la resultante de estas dos corrientes a los potenciales correspondientes al 20 % de repolarización y la duración del potencial de acción. Por este motivo decidimos representar la duración del potencial de acción respecto a la suma aritmética de las densidades de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  al potencial correspondiente al 20 % de repolarización, observándose una distribución de tipo exponencial (fig. 25 B). Al representar el logaritmo de la duración del potencial de acción con respecto a la suma de las densidades de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  al potencial correspondiente al 20 % de repolarización (fig. 25 D), observamos que existe una correlación mucho mejor que al representarlo separadamente ( $r = -0.82$ ,  $p = 0.00005$ ). La ecuación de la recta que mejor se ajustó a los puntos fue:

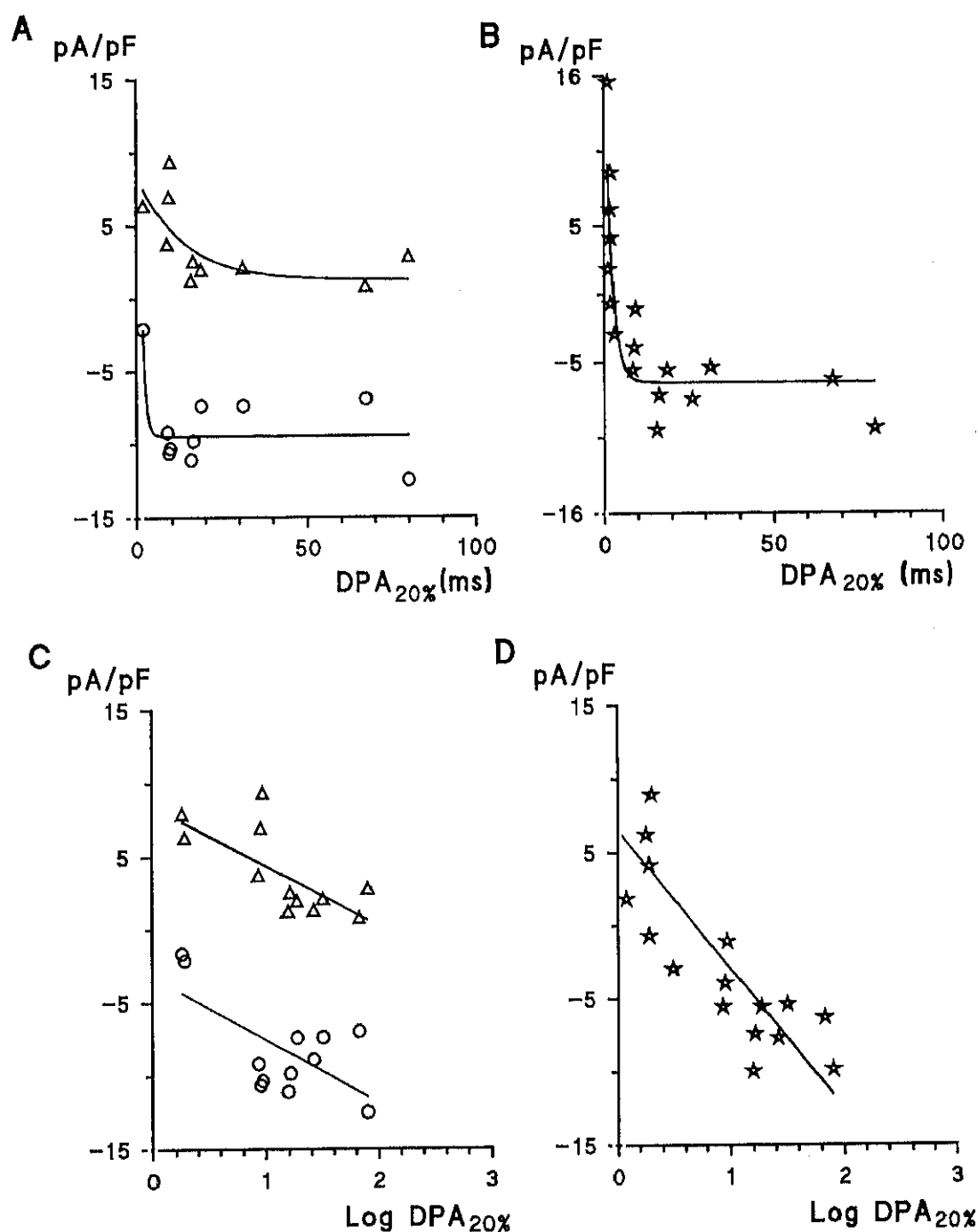
$$y = -9.5 x + 6.5$$

En las células aisladas del ápex realizamos los mismos análisis. El logaritmo decimal de la duración del potencial de acción no tuvo una buena correlación con las densidades de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  por separado (fig. 26 A), sin embargo, la suma de ambas, mostró una relación lineal ( $r = -0.79$ ,  $p < 0.01$ ) de la forma:

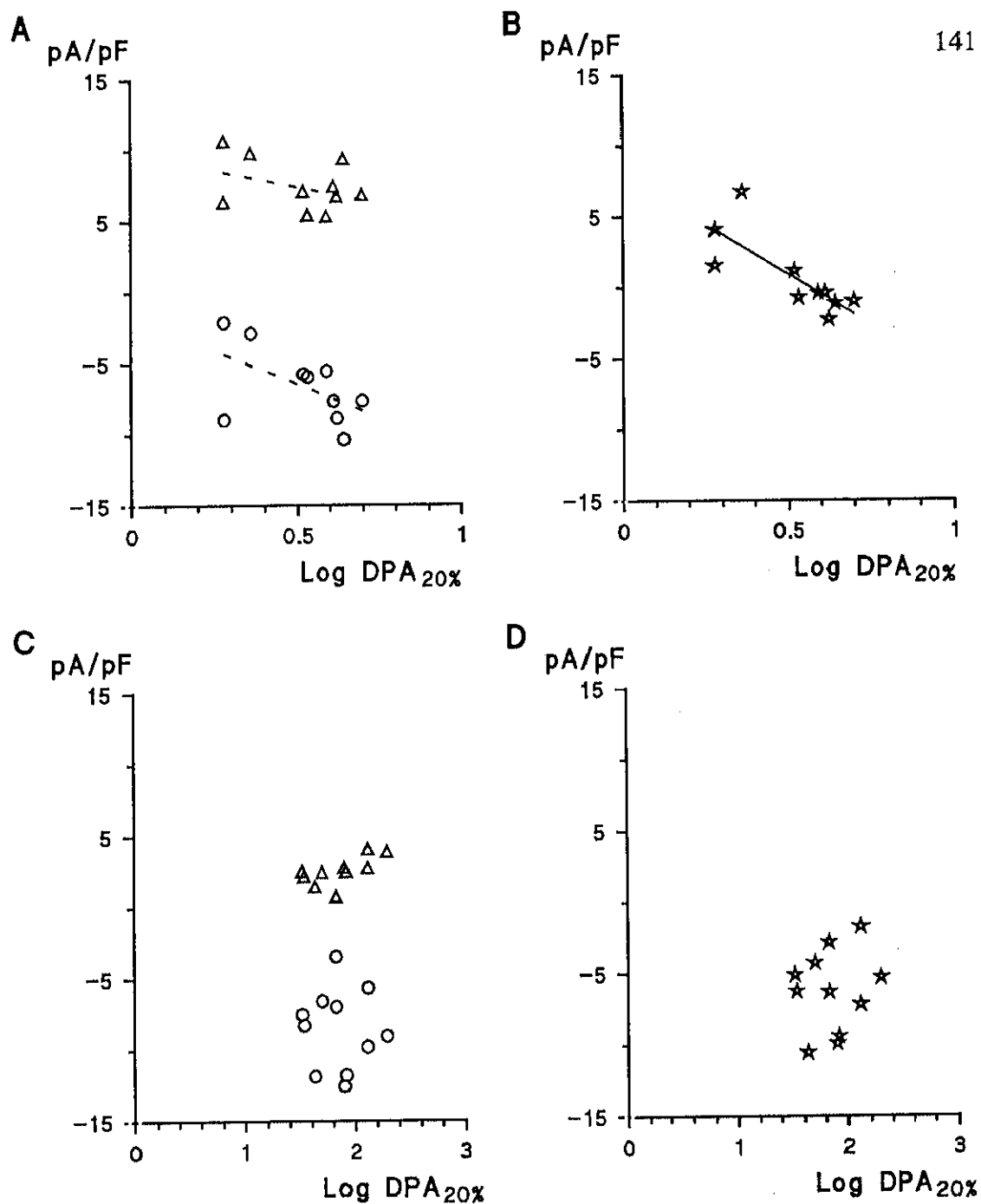
$$y = -14.2 x + 8.02$$

La relación entre la suma de las densidades de las corrientes estudiadas y el log de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización en las células de ápex y pared libre fue similar, como se deduce de las pendientes de las rectas halladas en ambas ( $-14.2 \pm 3.9$  en ápex, y  $-9.5 \pm 6.6$  en la pared libre), por lo que hallamos la regresión lineal de los valores obtenidos en células de estas dos regiones del corazón, obteniendo la recta ( $r = -0.82$ ,  $p = 0.0000001$ ) (fig. 27 A):

$$y = -9.3 x + 6.1$$



**Fig 25:** Representación de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización (DPA<sub>20%</sub>) en células controles de la pared libre del ventrículo izquierdo, frente a la densidad de corriente de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  (círculos y triángulos respectivamente, panel A) y la suma de ambas (estrellas, panel B). La línea es la curva que mejor se ajusta a los puntos, de forma monoexponencial. **C**, Representación del logaritmo de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización (log DPA<sub>20%</sub>) frente a las densidades de corrientes de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  (círculos y triángulos respectivamente) y la suma de ambas (estrellas, panel D) de las mismas células. Las rectas son la regresión lineal.



**Fig. 26:** A, representación del logaritmo decimal de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización ( $\log DPA_{20\%}$ ) en células controles de ápex, en relación a la densidad de  $I_{Ca}$  (círculos) e  $I_{to}$  (triángulos). B, representación del  $\log DPA_{20\%}$  frente a la suma de las densidades de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  en las mismas células. La línea es la regresión lineal. C, Igual que en A para células del septum; D, lo mismo que en el panel B, pero en células de septum.

En las células aisladas del septum interventricular de corazones controles, no se observó una relación similar a la encontrada en los otros dos grupos de células (fig. 26 B y C).

#### 4.4.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN CÉLULAS HIPERTRÓFICAS

Comparando los corazones hipertróficos con los controles encontramos un alargamiento de la duración del potencial de acción en las células del ápex y la pared libre, pero no así en las células del septum, la densidad de  $I_{to}$  disminuye en todas las partes y la de  $I_{Ca}$  se mantiene (ver tablas 16 y 17).

**Tabla 17:** Características de las células hipertróficas.

	APEX (n = 9)		PARED LIBRE (n = 10)		SEPTUM (n = 8)	
<b>Cm (pF)</b>	228.53 ± 24.2		280.05 ± 24.7		248.93 ± 22.59	
<b>PR (mV)</b>	-72.56 ± 1.41		-73.3 ± 1.59		-74.12 ± 1.62	
<b>Repol.</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>
<b>DPA (ms)</b>	20.49 ± 6.2	58.09 ± 15.4	34.02 ± 17.2	98.11 ± 33.7	30.27 ± 6.59	105.4 ± 14.8
<b><math>I_{Ca}</math> (pA/pF)</b>	-7.86 ± 0.98	-3.00 ± 0.79	-7.27 ± 0.65	-3.67 ± 1.01	-7.29 ± 0.58	-4.47 ± 1.99
<b><math>I_{to}</math> (pA/pF)</b>	3.56 ± 1.06	1.61 ± 0.7	4.00 ± 1.27	1.69 ± 0.72	1.76 ± 0.2	0.193 ± 0.1

**Cm**, capacitancia de membrana; **PR**, potencial de reposo; **DPA**, duración del potencial de acción medido al 20% y 50% de repolarización; **Repol.**, repolarización;  **$I_{Ca}/Cm$** , densidad de la corriente de calcio;  **$I_{to}/Cm$** , densidad de la corriente transitoria de salida de potasio.  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  fueron medidas al potencial correspondiente al 20% y 50% de repolarización del potencial de acción en cada células. Los valores expresan medias ± ESM.

Respecto a la duración del potencial de acción, estas células han perdido la clara heterogeneidad que existía en situación control. Hay que notar que la duración del potencial de acción de las células del septum, no está incrementada a pesar de que la corriente transitoria está disminuida. Esto no es tan extraño, puesto que según los datos obtenidos en células controles, no hemos detectado una relación entre la duración del potencial de acción y las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Ca}$  (fig 27 A). En realidad en las células hipertróficas no sólo se pierden las diferencias que existían en situación control, sino que además se pierde la normal relación entre estas corrientes y la forma del potencial de acción (fig. 27 B). De esta forma, aunque las células siguen teniendo diferencias en los potenciales de acción, son más homogéneas en la corriente suma de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$ .

El efecto de la disminución de la  $I_{to}$  y el mantenimiento de la  $I_{Ca}$ , es el aumento de la corriente neta de entrada. En la figura 27 se puede ver que, mientras que en situación control la corriente neta al 20 % de repolarización en ápex tiende a ser positiva (esto es, repolarizante) y en septum es siempre negativa (esto es, despolarizante), en los corazones hipertróficos siempre está por debajo de cero. También se ve muy claro este hecho en las figuras 28 y 29, en los trazos totales obtenidos en solución libre de sodio, se puede ver por ejemplo en el caso de ápex, que en la célula control (fig. 28) la corriente de entrada queda totalmente enmascarada por la prominente corriente de salida. En la célula hipertrófica (fig. 29) aún antes de poner la 4-AP ya se observa una corriente de entrada. Respecto a esta figura, nótese que las capacitancias de las células hipertróficas son obviamente mayores que las controles, por lo que aunque la corriente transitoria no varíe en amplitud entre las células controles y las hipertróficas, la densidad resulta disminuida, lo contrario ocurre con la corriente de calcio en la que para que la densidad no varíe, la corriente total por célula aumenta.

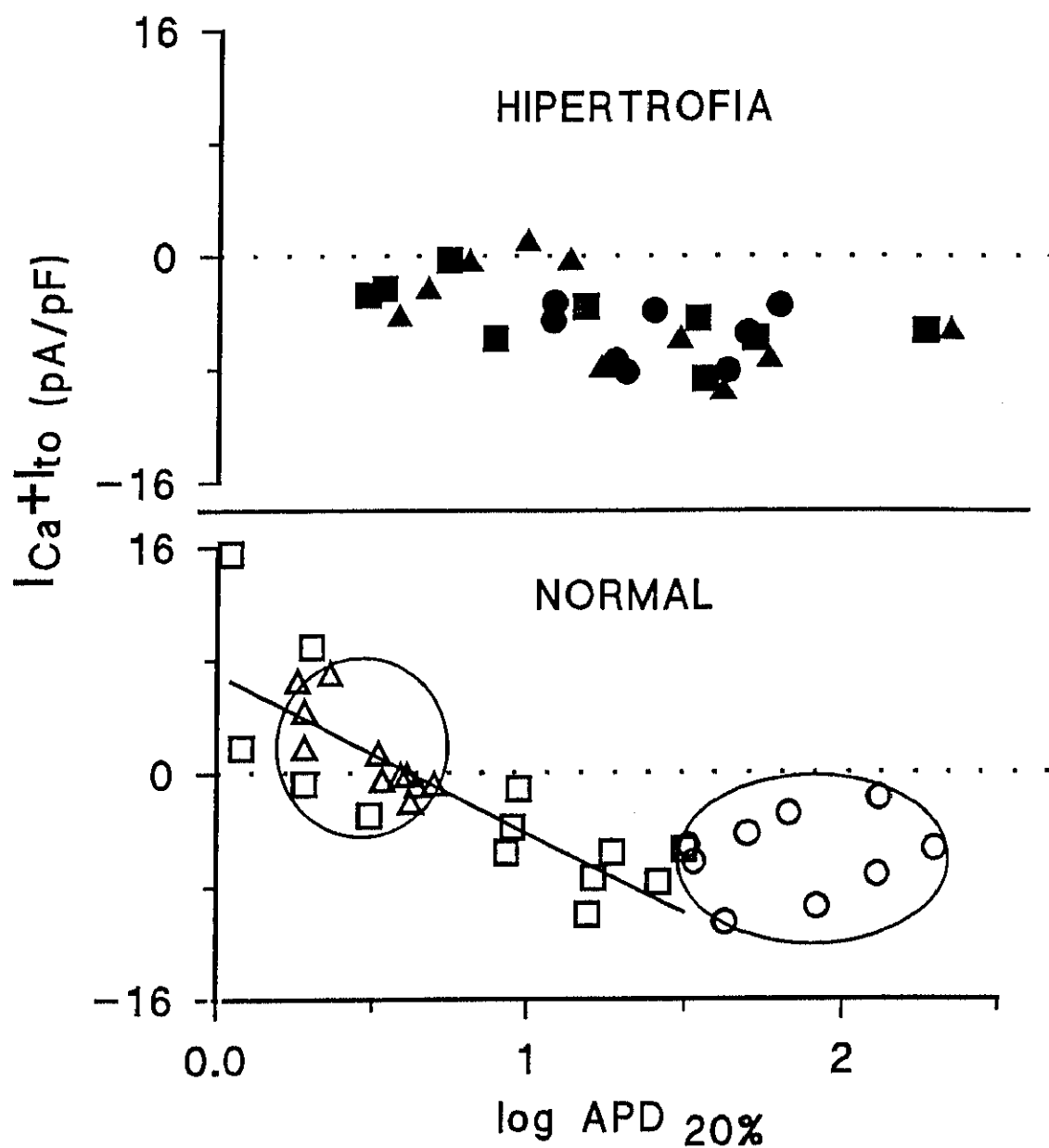
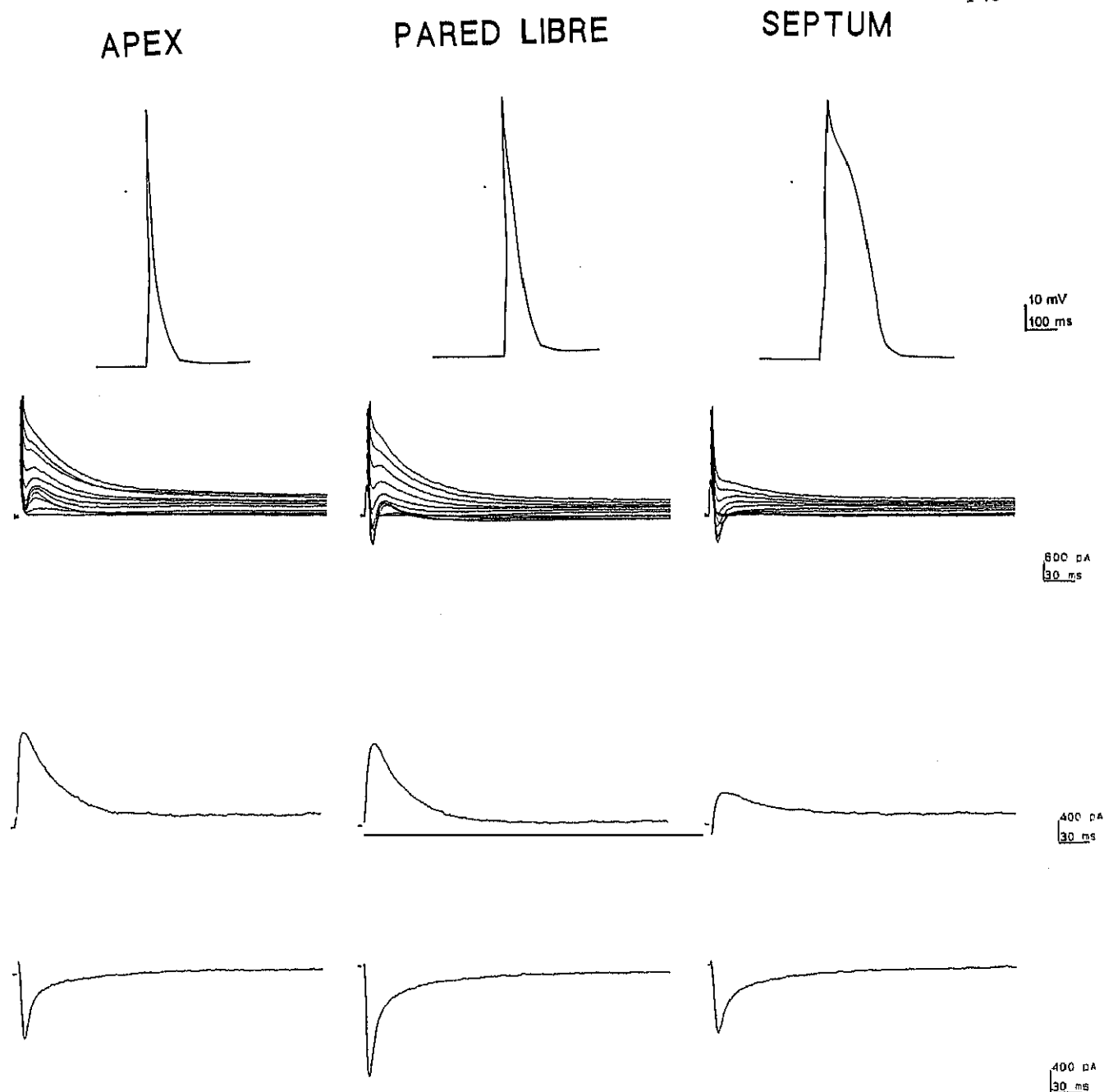
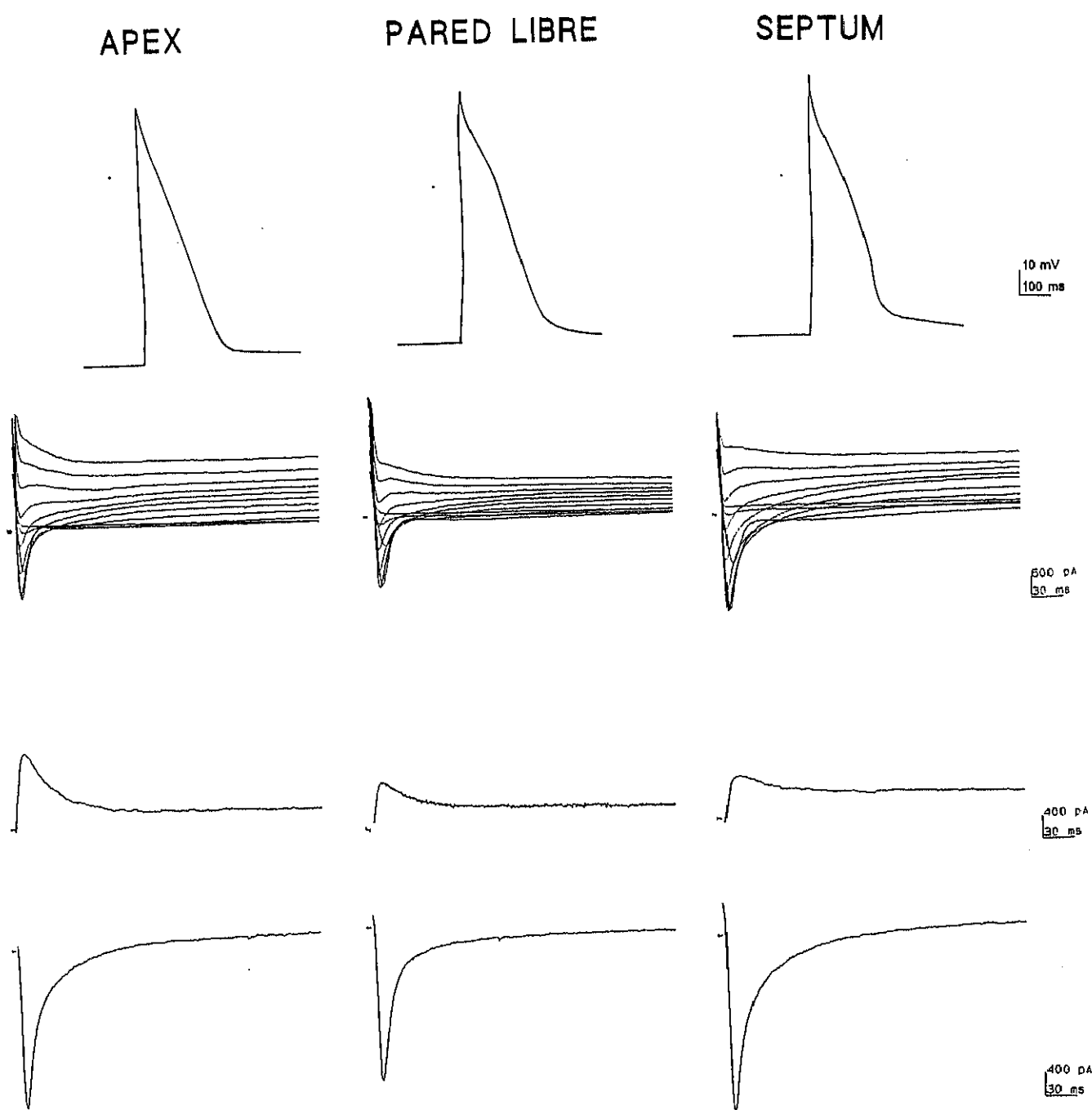


Fig. 27: Gráfica mostrando la relación entre el log de la duración del potencial de acción al 20 % de repolarización y la suma de las densidades de  $I_{Ca} + I_{to}$ , en células normales e hipertroóficas; Triángulos, miocitos de ápex; cuadrados, de pared libre; círculos, de septum. La regresión lineal para las células controles de ápex y pared libre es de la forma:  $y = -9.34 x + 6.1$ ;  $p=0.0000001$ .



**Fig. 28:** Ejemplos de trazos obtenidos en una célula control de cada localización estudiada: de ápex,  $C_m = 166.32$  pF; de pared libre,  $C_m = 167.62$  pF; y de septum,  $C_m = 181.60$  pF. De arriba a abajo, el potencial de acción, la corriente total registrada en solución libre de sodio,  $I_o$  (corriente sensible a 4-AP) registrada a +40 mV e  $I_{Ca}$  (corriente sensible a  $Co^{2+}$ ) registrada a 0 mV.



**Fig. 29:** Ejemplos de trazos obtenidos en una célula hipertrófica de cada localización estudiada: de ápex,  $C_m = 283.81$  pF; de pared libre,  $C_m = 309.47$  pF; y de septum,  $C_m = 299.89$  pF. De arriba a abajo, el potencial de acción, la corriente total registrada en solución libre de sodio,  $I_{to}$  (corriente sensible a 4-AP) registrada a +40 mV e  $I_{Ca}$  (corriente sensible a  $Co^{2+}$ ) registrada a 0 mV.



#### 4.4.4.- SÍNTESIS

La duración del potencial de acción está distribuida de forma heterogénea en el ventrículo izquierdo de la rata, pudiéndose ordenar las partes estudiadas de menor a mayor duración: ápex < pared libre < septum. Esta diferencia está relacionada con la corriente resultante de la  $I_{to}$  y la  $I_{Ca}$ . La mayor diferencia entre las células de ápex y pared libre respecto a las de septum es la pequeña corriente transitoria registrada en el último grupo. Los potenciales de acción de las células de septum no siguen la misma relación que las otras dos partes entre el potencial de acción y las corrientes  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$ .

Las células hipertróficas de ápex y pared libre, presentan potenciales de acción más prolongados, a consecuencia de la menor densidad de corriente transitoria, que resulta en un incremento de la corriente neta de entrada. Las células hipertróficas del septum, a pesar de tener disminuida la densidad de  $I_{to}$ , no presentan potenciales de acción más prolongados en la hipertrofia. Las células hipertróficas no presentan la misma heterogeneidad que las células controles, ni la misma relación entre la duración del potencial de acción y las corrientes estudiadas.

Puesto que las células de septum no aumentan la duración del potencial de acción a pesar de disminuir la corriente transitoria de salida, sería posible que la alteración en otra corriente cuyo efecto sea acortador del potencial de acción, esté contrarrestando el efecto prolongador de la disminución de la  $I_{to}$ . Las corrientes de fondo pueden disminuir la duración del potencial de acción. En este sentido, Watanabe y cols. (1983) sugirieron que la fase de repolarización rápida del potencial de acción en la rata, dependería además de las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Ca}$ , de la corriente de fondo. Algunos estudios realizados en corazón hipertrófico han encontrado un aumento general en la  $I_{K1}$  (Ten Eik y cols., 1977; Barrington y cols., 1988; Kleiman y Houser, 1989). Por lo tanto, decidimos estudiar la corriente de fondo total de las células de ápex, pared libre y septum, en corazones controles e hipertróficos, analizando el componente debido a la  $I_{K1}$  de esta corriente de fondo total.

## 4.5.- ESTUDIO DE LA CORRIENTE DE FONDO

### 4.5.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Los experimentos se llevaron a cabo en 6 ratas controles y 9 hipertróficas. El peso corporal de las ratas con estenosis aórtica no fue diferente del de las controles, pero sí el peso de los corazones, que fueron significativamente mayores (ver tabla 18). De este modo, el ratio peso corazón/peso corporal fue significativamente mayor en el grupo de animales con estenosis aórtica, lo que fue nuestro criterio de selección para determinar la presencia de hipertrofia ventricular izquierda. Incrementos similares en este ratio y en el peso de los corazones han sido encontrados por otros investigadores (Scamps y cols., 1990; Anversa y cols., 1978).

**Tabla 18:** Características de las ratas controles e hipertróficas.

	Peso corporal (g)	Peso corazón (g)	Ratio (mg/g) corazón/cuerpo
Control (n=6)	444.5 $\pm$ 50.3	1.7 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.3
Hipertrofia (n=9)	435.1 $\pm$ 50.3	2.0 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.5

Los datos están expresados como medias  $\pm$  DSM.

La superficie total de la membrana calculada teniendo en cuenta las medidas ópticas de anchura y largura de la célula resulta infravalorada, puesto desestima las invaginaciones de la membrana del sarcolema, las cuales constituyen más del 70% de la superficie total (Severs y cols., 1982), por lo que utilizamos las medidas de la capacitancia de la membrana como una forma más fiable para estimar la superficie celular. Las corrientes obtenidas en cada célula fueron normalizadas por su correspondiente capacitancia, de modo que obtuvimos la densidad de corriente. Las capacitancias (Tabla 19) fueron significativamente mayores en los miocitos hipertróficos (n=61) que en los controles (n=37),

indicando un incremento en el área eléctricamente cargable en las células hipertróficas, lo que puede ser atribuido al incremento de la superficie de la membrana. Sin embargo, no hubo diferencias regionales en las capacitancias, ni en situación control, ni en hipertrofia. El potencial de los miocitos en la solución externa normal al cual la corriente es cero, tampoco mostró variaciones con la distinta topografía, ni en células aisladas de corazones controles (en mV:  $-76.5 \pm 4.4$  en ápex ( $n=12$ ),  $-77.2 \pm 6.0$  en pared libre ( $n=14$ ), y  $-77.8 \pm 6.2$  en septum ( $n=12$ )) ni de corazones hipertróficos (en mV:  $-77.5 \pm 6.6$  en ápex ( $n=17$ ),  $-79.7 \pm 6.1$  en pared libre ( $n=19$ ), y  $-77.0 \pm 6.1$  en septum ( $n=19$ )).

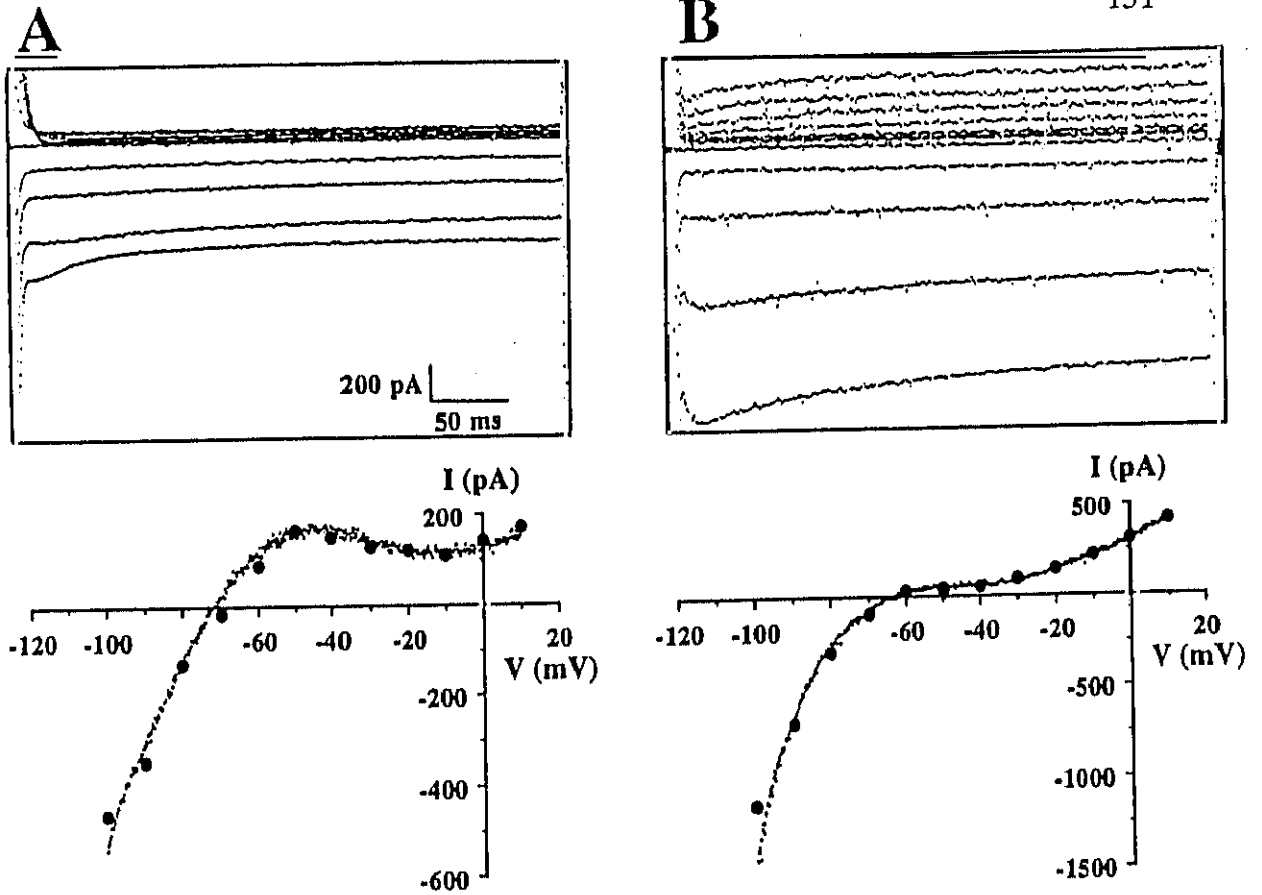
#### 4.5.2.- SOLUCIONES EMPLEADAS

Para medir la corriente de fondo, las células fueron perfundidas con una solución (ver sección métodos) que carecía de sodio para evitar las corrientes dependientes de este ión. Además contenía  $\text{CoCl}_2$  para bloquear la corriente de calcio, 4-AP para aminorar la corriente transitoria de salida y atropina para evitar las corrientes de potasio muscarínicas activadas por acetilcolina (Lefevre y cols., 1991). La osmolaridad final de esta solución fue de 288 mosm/Kg. En experimentos destinados a estudiar la selectividad al potasio de la corriente de fondo, las diferentes concentraciones de  $\text{K}^+$  se consiguieron por sustituciones equimolares de KCl por cloruro de colina, por lo que la concentración de cloro no varió. En algunos experimentos se disolvieron algunos compuestos en la solución externa, inmediatamente antes de su uso. Estas sustancias fueron:  $\text{BaCl}_2$ , 2 mM; CsCl, 20 mM (estas sales reemplazaron cantidades equimolares de colina); glibencamida, 20  $\mu\text{M}$ ; ouabaína, 1  $\mu\text{M}$ ; ácido 9 antraceno carboxílico (9-AC), 5 mM (disuelto en solución externa caliente con fuerte agitación y ajustada después a pH 7.4); ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno 2,2'-disulfónico (DIDS), 0.1 mM (disuelto directamente en la solución externa caliente y a pH 8); metoxamina, 0.1 mM; isoproterenol, 1  $\mu\text{M}$  (la solución stock fue preparada diariamente). En algunos experimentos se utilizó cloruro de tetraetilamonio, sustituyendo a concentraciones equimolares de cloruro de colina. La osmolaridad de la solución interna (ver composición en sección métodos) fue de 289 mosm/kg. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25-30° C) para enlentecer la cinética de activación y mejorar el control del voltaje.

#### 4.5.3.- CORRIENTE DE FONDO TOTAL

Las corrientes de fondo fueron registradas desde un potencial de membrana de -60 mV, en respuesta a pulsos de 500 ms de duración que variaron desde -100 mV hasta +10 mV, con incrementos 10 mV, e intervalos de 5 s. También se registró las corrientes utilizando una rampa (18.4 mV/s) desde -100 hasta +10 mV (desde un potencial de -60 mV). No se repitieron dos rampas sin dejar pasar menos de 20 s. Para clarificar, y puesto que no se observaron variaciones topográficas en esta corriente, en el texto sólo damos los datos medios de las células controles e hipertróficas, aunque en las tablas están desglosados según su procedencia regional.

Tanto en el grupo de células controles como hipertróficas, los pulsos de voltaje evocaron una corriente con las características de la corriente de rectificación de entrada de potasio (esto es, con activación e inactivación a potenciales hiperpolarizados) (Isenberg, 1976; Stanfield y cols., 1980; Sakman y Trube, 1984; Harvey y Ten Eik, 1988). Como se ve en la figura 30, en una célula control (panel A) y otra hipertrófica (panel B) de pared libre, a -100 mV se activó rápidamente una gran corriente de entrada que disminuyó lentamente. Potenciales menos negativos (-90 y -80 mV) evocaron una corriente de entrada más pequeña que decayó lentamente. A potenciales cercanos al de reposo de la célula (-70 a -60 mV) las corrientes fueron pequeñas, de entrada o de salida. Las corrientes de salida alcanzaron un máximo a potenciales alrededor de -50 mV, se activaron rápidamente y no mostraron una dependencia del tiempo como las de entrada (Matsuda, 1988). En las células controles, las corrientes a voltajes de -40 a -20 mV disminuyeron, con respecto a las obtenidas a -50 mV, demostrando la existencia de una pendiente negativa y una fuerte rectificación de entrada.



**Fig 30:** Ejemplos representativos de la corriente total de fondo en miocitos controles e hipertróficos de la pared libre del ventrículo izquierdo utilizando los protocolos de pulsos y rampa. **Panel A:** Célula control. En el recuadro se ven los trazos de las corrientes en respuesta a pulsos de 500 ms de duración, desde un potencial de -60 mV hasta potenciales test desde -100 a +10 mV (incrementos de 10 mV), en una solución externa que contenía 4 mM de  $K^+$ . Debajo, gráfica que muestra la superposición de la corriente obtenida por una rampa de voltaje (línea continua) con la corriente obtenida al final de cada pulso test (círculos rellenos).  $C_m = 137.10$  pF. **Panel B:** Célula hipertrófica. En el recuadro se ven las corrientes evocadas por los pulsos de voltaje, y debajo la superposición de la corriente evocada por la rampa (línea) y por los pulsos de voltaje (círculos rellenos).  $C_m = 324.62$  pF.

Las curvas corriente-voltaje se construyeron representando la corriente al final de los 500 ms frente a los potenciales test (fig 30). La curva de las células controles tuvo forma de "N", con una pendiente negativa entre los potenciales -50 y -20 mV. La corriente obtenida en respuesta a la rampa (18.4 mV/s) desde -100 a +10 mV fue superponible con la determinada por los pulsos (fig 30). Puesto que la curva corriente-voltaje obtenida con los pulsos y la rampa fue casi idéntica, utilizamos las rampas de voltaje para estudiar las corrientes de fondo. Para descartar cualquier error debido a la corriente capacitativa, la magnitud de la corriente a -100 mV fue medida 36 ms después de comenzar la rampa, esto es, a un potencial de -99.56 mV.

Todas las células controles (n=28) mostraron un comportamiento similar. Para voltajes más negativos que el potencial de reversión, la corriente de entrada disminuyó según el potencial de membrana aumentó, empezando desde una magnitud de alrededor de -4.3 pA/pF -100 mV, para alcanzar el cero a un potencial de reversión de -72.8 mV (ver tabla 19), muy cercano al potencial de reposo. La corriente máxima de salida se obtuvo alrededor de -50 mV, después de la cual, se observó una zona de pendiente negativa entre -50 y -20 mV.

En las células hipertróficas (n=41) la forma de la curva corriente-voltaje fue distinta. No se observó una zona de pendiente negativa. La zona entre -50 y -20 mV fue casi plana (fig 30 B). La rectificación de entrada y una inactivación en el tiempo de los pulsos más hiperpolarizados fue también observado. La media de la densidad de corriente a -100 mV fue significativamente mayor (-5.2 pA/pF) que en el grupo control ( $p < 0.005$ ). El potencial de reversión no fue distinto que en las células controles, lo que estuvo de acuerdo con la falta de diferencias en los potenciales de reposo. El potencial de reversión en estas células hipertróficas estuvo alrededor de -71.0 mV, n=41.

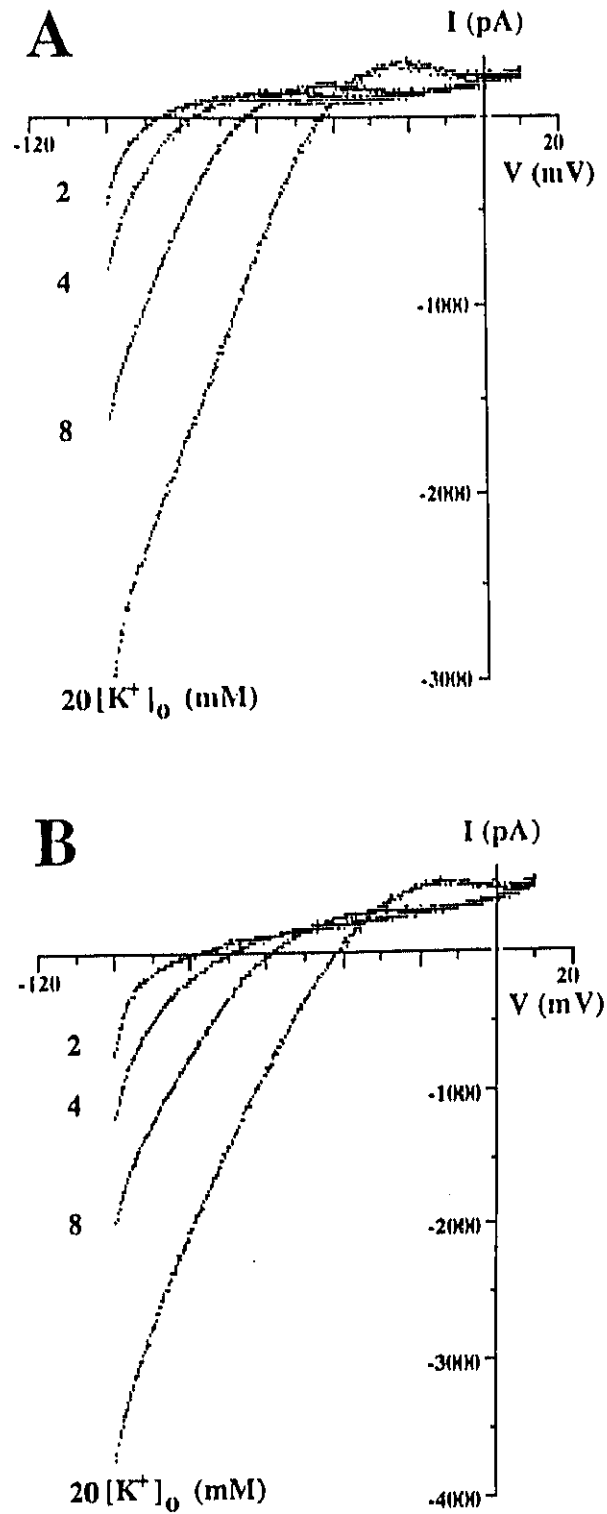
La conductancia, entre el potencial de corriente cero y -95 mV, utilizando las densidades de corriente, fue significativamente mayor en las células hipertróficas (en  $\mu\text{S/pF}$ : 0.126 en control (n=28), y 0.157 en hipertrofia (n=41),  $p < 0.005$ ), mientras que no se observaron diferencias entre las células de distinta localización (tabla 19).

**Tabla 19:** Características de la corriente de fondo total en células controles e hipertróficas.

		$C_m$ (pF)	$I_{-100}$ (pA/pF)	$V_{rev}$ (mV)	$G_i$ ( $\mu S/pF$ )
<b>APEX</b>	C [n=9]	$169.3 \pm 32.7$	$-4.37 \pm 1.5$	$-69.9 \pm 7.3$	$0.120 \pm 0.031$
	H [n=14]	$220.1 \pm 68.2$	$-5.17 \pm 1.3$	$-70.9 \pm 5.4$	$0.163 \pm 0.060$
<b>PARED LIBRE IZQ</b>	C [n=10]	$178.7 \pm 55.2$	$-4.19 \pm 1.0$	$-72.5 \pm 2.9$	$0.126 \pm 0.031$
	H [n=12]	$244.6 \pm 91.2$	$-5.61 \pm 1.7$	$-72.7 \pm 5.4$	$0.172 \pm 0.060$
<b>SEPTUM</b>	C [n=9]	$177.7 \pm 59.4$	$-4.36 \pm 1.0$	$-74.0 \pm 5.5$	$0.131 \pm 0.027$
	H [n=15]	$228.6 \pm 59.9$	$-5.10 \pm 1.0$	$-74.5 \pm 5.1$	$0.148 \pm 0.050$

$C_m$ , capacitancia de membrana; C, miocitos procedentes de corazones controles; H, miocitos aislados de corazones hipertróficos;  $I_{-100}$ , densidad de corriente a -100 mV (para evitar errores debidos a la corriente capacitativa, en realidad está medida 36 ms después de comenzar el protocolo, lo cual corresponde a -99.56 mV);  $V_{rev}$ , potencial de reversión;  $G_i$ , conductancia de entrada, medida entre el potencial de corriente cero y -95 mV, utilizando los valores de la corriente normalizados por su correspondiente capacitancia. Los datos están expresados como medias  $\pm$  DSM.

La selectividad iónica de esta corriente de fondo fue estudiada analizando los cambios provocados en la curva corriente-voltaje a distintas concentraciones externas de potasio. En la fig 31 se representan las curvas corriente-voltaje de una célula de ápex control (A), y otra hipertrófica, también de ápex (B), obtenidas a distintas concentraciones de potasio externo ( $[K^+]_o$ ). En la célula control, a 4 mM de  $K^+$ , el potencial de reposo y el de reversión fue de -80 mV y -77 mV respectivamente, y la corriente de salida fue pequeña. Cuando  $[K^+]_o$  aumentó hasta 8 mM, y luego hasta 20 mM, el potencial de reposo se despolarizó hasta -69 mV y -49 mV respectivamente. El potencial de reversión varió



**Fig. 31:** Efectos de la alteración en la concentración externa de potasio en la corriente total de fondo frente al voltaje. Registros representativos obtenidos en dos miocitos de septum, uno control (panel A,  $C_m = 175.88$  pF), y otro hipertrófico (panel B,  $C_m = 255.47$  pF). Las curvas fueron registradas con las rampas en cuatro concentraciones diferentes de  $K^+$  externo, las cuales están indicadas a la izquierda de cada curva.

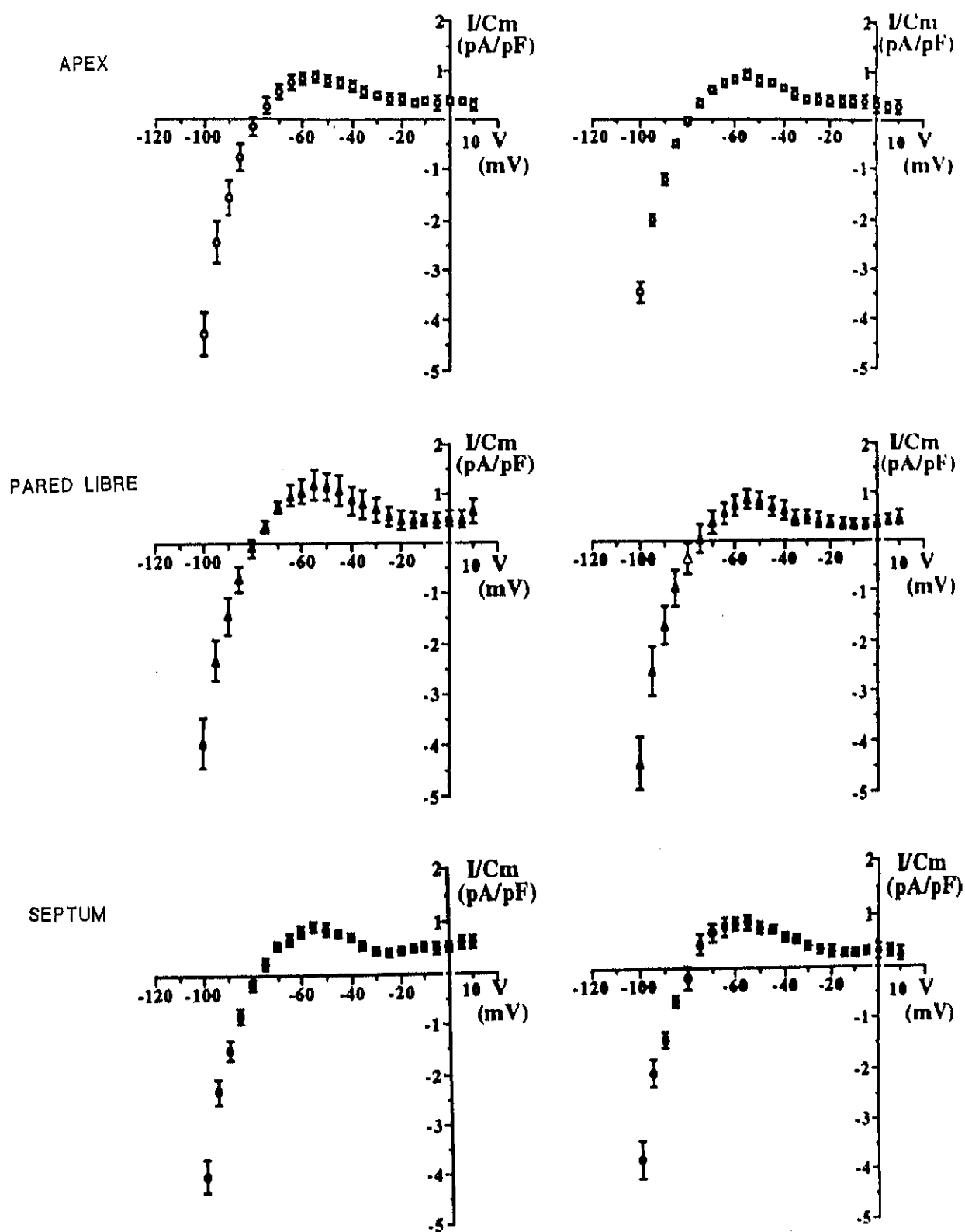


hacia valores más positivos (+13 mV y +33 mV, respectivamente), resultando pues en un desplazamiento de 66 mV para un cambio de 10 veces la concentración de potasio, como era de esperar de la ecuación de Nerst, para una permeabilidad selectiva al potasio. Un descenso en  $[K^+]_o$  hasta 2 mM desplazó el potencial de reposo hasta -91 mV y el potencial de reversión -9.5 mV. En media, las variaciones en la  $[K^+]_o$  en múltiplos de 10 modificaron aproximadamente 64 mV el potencial de reversión. En las células controles, este desplazamiento del potencial de reversión fue, en mV,  $64.0 \pm 10.8$  en ápex ( $n=5$ ),  $64.5 \pm 8.0$  en la pared libre ( $n=5$ ), y  $63.9 \pm 5.6$  en septum ( $n=5$ ); y en el potencial de reposo de  $63.2 \pm 9.5$  mV,  $61.0 \pm 7.3$  mV, y  $63.7 \pm 4.4$  en ápex, pared libre y septum respectivamente. Como se puede observar no se encontraron diferencias entre grupos de distinta procedencia regional.

En las células hipertróficas, el incremento en la  $[K^+]_o$  también indujo desplazamientos despolarizantes en el potencial de reversión con la aparición de una pequeña zona de pendiente negativa a  $[K^+]_o$  de 20 mM. En el ejemplo representativo mostrado en la fig 31, panel B, el potencial de reversión fue -69.8 mV, -58.8 mV, y -42.4 mV para una  $[K^+]_o$  de 4, 8, y 20 mM respectivamente, resultando en un cambio de 56 mV, para una variación de 10 mM de  $[K^+]_o$ . Sin embargo, en el total de las células hipertróficas, no hubo diferencias en la variación del potencial de reversión por cada cambio de 10 veces en la  $[K^+]_o$  (en mV:  $64.2 \pm 5.3$  en ápex ( $n=5$ ),  $66.6 \pm 4.1$  en la pared libre ( $n=5$ ), y  $66.6 \pm 6.3$  en el septum ( $n=5$ ). Este hallazgo sugiere que el principal ión transportador de carga en las corrientes de fondo en todos los grupos de células estudiados es el potasio.

#### 4.5.4.- CORRIENTE DE RECTIFICACIÓN DE ENTRADA

Para caracterizar el componente debido a la corriente de rectificación de entrada ( $I_{K1}$ ) de la corriente de fondo total, estudiamos el efecto de 2 mM de  $BaCl_2$  en 21 células controles y en 28 hipertróficas. Después de 1 min de exposición al bario, la corriente de fondo evocada por la rampa de voltaje disminuyó tanto en la dirección de entrada como en la de salida, resultando en una curva corriente-voltaje casi lineal, con una pendiente



**Fig 32:** Corriente de rectificación de entrada,  $I_{K1}$ , en ápex, pared libre y septum (de arriba a abajo) aislados de corazones controles (izquierda, C) e hipertróficos (derecha, H). La relación densidad de corriente-voltaje, determinada de los registros obtenidos con la rampa de voltaje, fueron obtenidos por sustracción de la curva antes y después de la adición de 2 mM de  $BaCl_2$  y normalizados por la capacitancia de cada célula. Los valores son medias  $\pm$  ESM.

claramente diferente entre las células controles y las hipertróficas. Los efectos del bario fueron revertidos completamente en 2 min de lavado. La adición de 20 mM de  $\text{CsCl}_2$  provocó los mismos resultados. La  $I_{K1}$  fue estimada como la corriente sensible a bario, obtenida por la sustracción de la corriente evocada en presencia de bario a la corriente obtenida antes de añadirsele. La media de las densidades de corriente en función del voltaje en cada grupo de células estudiado están representadas en la fig 32. La forma y la magnitud de la  $I_{K1}$  no fue diferente ni entre células controles e hipertróficas ni entre diferentes regiones. La media de las densidades de corriente a -100 mV fue de -4.0 pA/pF en el total del grupo control (n=21), y -3.9 pA/pF para el total de las células hipertróficas (n=28). Todas las curvas corriente-voltaje mostraron una forma de "N", cruzando el eje de voltaje a un punto cercano al potencial de equilibrio del potasio y al potencial de reposo, con un máximo de corriente de salida a un voltaje 20-30 mV positivo al de reversión. En media, el potencial de reversión fue de -79.2 mV para los miocitos aislados de corazones controles (n=21), y -79.4 mV para los miocitos aislados de corazones hipertróficos (n=28). Cuando se compararon las células controles con las hipertróficas, la corriente  $I_{K1}$  media a 55 mV, fue casi idéntica en cada región, en pA/pF:  $1.003 \pm 0.302$  (n=7) frente a  $1.112 \pm 0.366$  (n=9) en ápex,  $1.177 \pm 0.418$  (n=7) frente a  $1.110 \pm 0.384$  (n=9) en la pared libre, y  $1.154 \pm 0.192$  (n=7) frente a  $1.057 \pm 0.285$  (n=11) en septum (control frente a hipertrofia, respectivamente). Para potenciales más positivos a -55 mV, la curva corriente-voltaje exhibió una pendiente negativa en todos los grupos estudiados. La curva corriente-voltaje de la  $I_{K1}$  no fue diferente ni entre control-hipertrofia ni en células procedentes de distintas localizaciones del ventrículo izquierdo (ver tabla 20).

#### 4.5.5.- CORRIENTE INSENSIBLE A BARIO

Para identificar la diferencia encontrada en la corriente de fondo entre las células controles y las hipertróficas, analizamos la corriente insensible a bario. La figura 33 A muestra una corriente resistente a bario de forma lineal y casi plana. Ésto se encontró tanto en apex, como en pared libre y septum, en total n=21. Así pues en estas células, la mayoría de la corriente de fondo viene dada por la  $I_{K1}$ . En la figura 33 B se muestra que el bario no redujo la corriente de fondo en las células hipertróficas en la misma medida

**Tabla 20:** Características de la  $I_{K1}$  en células controles e hipertróficas.

		$I_{-100}$ (pA/pF)	$V_{rev}$ (mV)	$G_i$ ( $\mu$ S/pF)
<b>APEX</b>	<b>C</b> [n=7]	$-4.27 \pm 1.08$	$-79.2 \pm 3.6$	$0.156 \pm 0.025$
	<b>H</b> [n=9]	$-3.74 \pm 0.98$	$-79.9 \pm 2.7$	$0.148 \pm 0.026$
<b>PARED LIBRE IZQ</b>	<b>C</b> [n=7]	$-3.93 \pm 1.31$	$-80.2 \pm 4.5$	$0.150 \pm 0.049$
	<b>H</b> [n=9]	$-4.41 \pm 1.25$	$-79.6 \pm 6.5$	$0.139 \pm 0.031$
<b>SEPTUM</b>	<b>C</b> [n=7]	$-3.99 \pm 0.85$	$-78.2 \pm 5.3$	$0.138 \pm 0.031$
	<b>H</b> [n=10]	$-3.80 \pm 0.81$	$-80.1 \pm 6.7$	$0.152 \pm 0.029$

C, miocitos procedentes de corazones controles; H, miocitos aislados de corazones hipertróficos;  $I_{-100}$ , densidad de corriente a -100 mV (para evitar errores debidos a la corriente capacitativa, en realidad está medida 36 ms después de comenzar el protocolo, lo cual corresponde a -99.56 mV);  $V_{rev}$ , potencial de reversión;  $G_i$ , conductancia de entrada, medida entre el potencial de corriente cero y -95 mV, utilizando los valores de la corriente normalizados por su correspondiente capacitancia. Los datos están expresados como medias  $\pm$  DSM.

que en las controles. De las 35 células hipertróficas estudiadas en solución con bario, 33 se comportaron de la forma que acabamos de explicar, las otras 2 fueron excluidas del análisis. La media de las corrientes de entrada evocadas a -100 mV, en presencia de 2 mM de  $BaCl_2$  (ver tabla 21), en las células controles (n=21) fue de -0.72 pA/pF, frente a -2.08 pA/pF que se encontró en las células hipertróficas (n=33). La conductancia fue 0.012  $\mu$ S/pF y 0.026  $\mu$ S/pF en células controles e hipertróficas respectivamente. Estos datos sugieren que en las células hipertróficas, además de la corriente  $I_{K1}$ , existe otra corriente de fondo.

**Tabla 21:** Características de la corriente resistente a bario en células controles e hipertróficas.

		$I_{100}$ (pA/pF)	$V_{rev}$ (mV)	$G_i$ ( $\mu$ S/pF)
APEX	C [n=7]	$-0.76 \pm 0.53$	$-34.5 \pm 17.2$	$0.013 \pm 0.004$
	H [n=11]	$-2.21 \pm 1.51$	$-30.5 \pm 13.0$	$0.028 \pm 0.005$
PARED LIBRE IZQ	C [n=7]	$-0.75 \pm 0.46$	$-43.5 \pm 15.3$	$0.14 \pm 0.008$
	H [n=11]	$-2.04 \pm 1.10$	$-27.7 \pm 13.8$	$0.026 \pm 0.005$
SEPTUM	C [n=7]	$-0.64 \pm 0.38$	$-43.7 \pm 19.9$	$0.010 \pm 0.005$
	H [n=11]	$-2.00 \pm 0.83$	$-30.3 \pm 18.6$	$0.025 \pm 0.005$

C, miocitos procedentes de corazones controles; H, miocitos aislados de corazones hipertróficos;  $I_{100}$ , densidad de corriente a -100 mV (para evitar errores debidos a la corriente capacitativa, en realidad está medida 36 ms después de comenzar el protocolo, lo cual corresponde a -99.56 mV);  $V_{rev}$ , potencial de reversión;  $G_i$ , conductancia de entrada, medida entre el potencial de corriente cero y -95 mV, utilizando los valores de la corriente normalizados por su correspondiente capacitancia. Los datos están expresados como medias  $\pm$  desviación estándar.

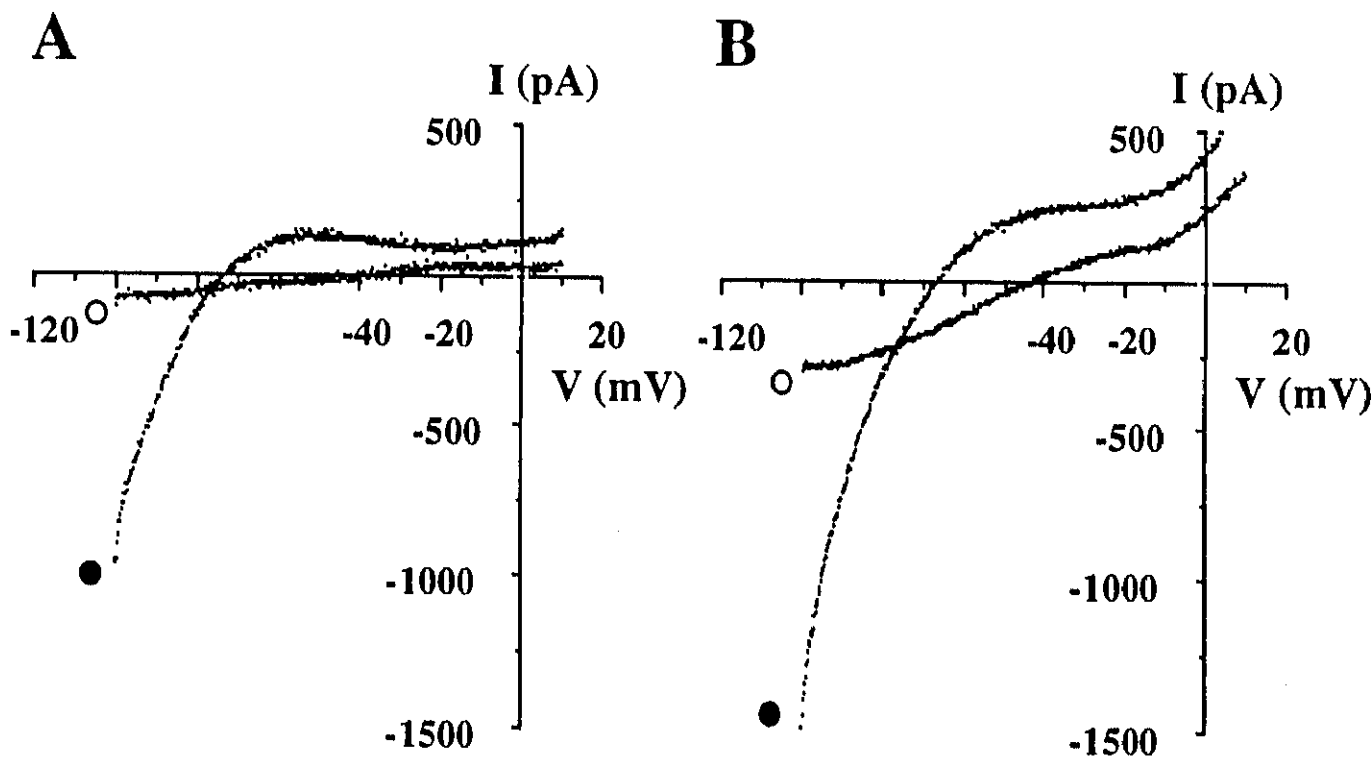
#### 4.5.5.1.- Distinción de la corriente insensible a bario de otras corrientes de potasio

Para identificar la naturaleza iónica de la corriente de fondo adicional encontrada en las células hipertróficas, intentamos excluir la contribución de otras corrientes de potasio conocidas, como la  $I_{K1}$ ,  $I_{Kp}$ ,  $I_{K,ATP}$ , e  $I_K$ . Las dos primeras no estarán implicadas puesto que se bloquean por concentraciones de bario en el rango milimolar (Shah y cols., 1987; Turneur, 1987; Backx y Marbán, 1993). Varias consideraciones hacen que sea improbable la contribución de  $I_K$  a la corriente de fondo resistente a bario. Primero, todos

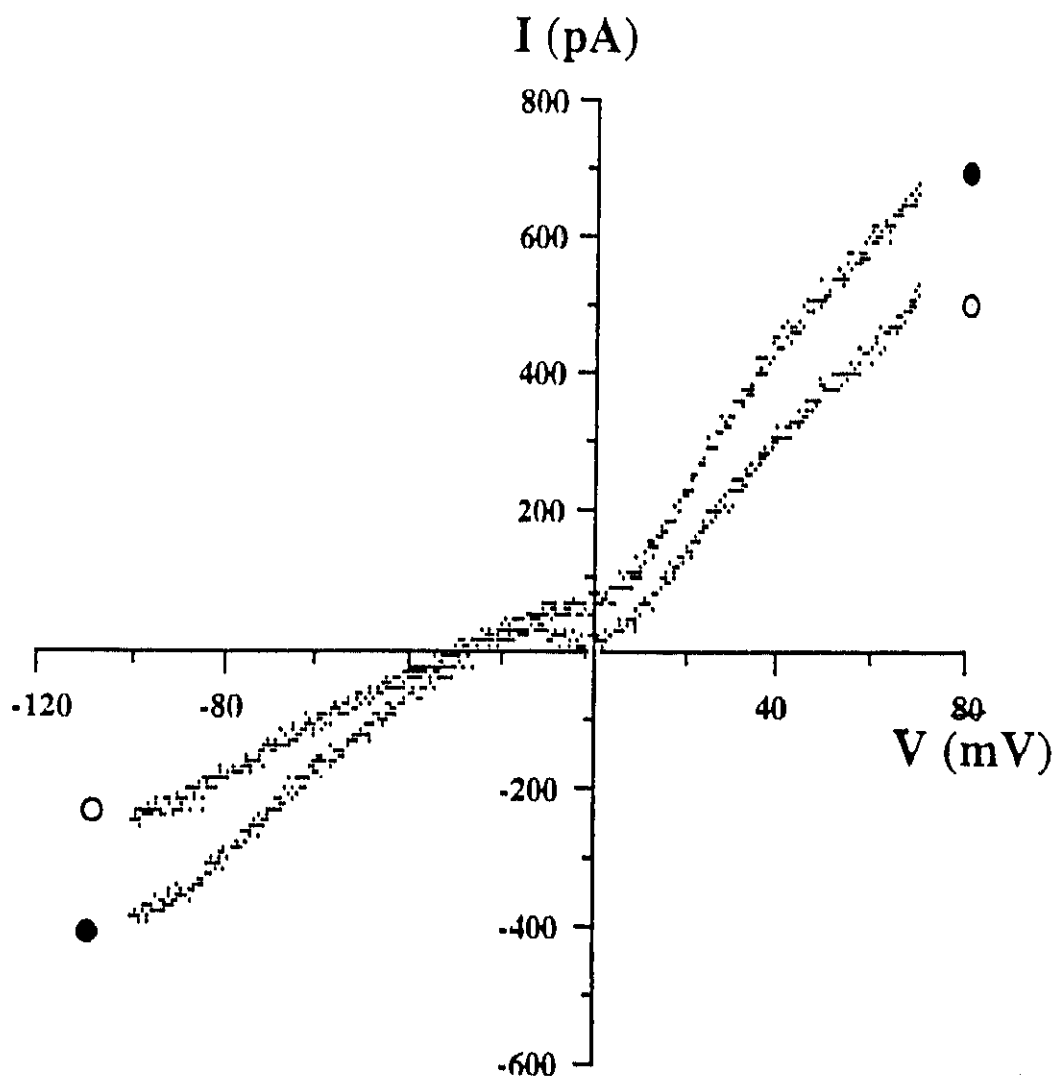
los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente; segundo, no se registraron colas de caída de corriente ni los cambios dependientes del tiempo que caracterizan a la  $I_K$  (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Balser y cols., 1990); tercero, este tipo de corriente es probablemente ausente en ratas adultas (Mahler, 1992). En nuestras condiciones experimentales, es probable que algunas corrientes de salida clasificadas como corriente de rectificación tardía podrían estar activas. Pero es muy poco probable que el componente mantenido de la corriente de salida activado por despolarización (Apkon y Nerbonne, 1991) esté implicado en la corriente insensible a bario que hemos encontrado en las células hipertróficas, puesto que la sustitución de cloruro de TEA por cloruro de colina en la solución externa ( $n=5$ ), no indujo ningún cambio. La relación de la corriente objeto de estudio, con la corriente de rectificación de entrada rápidamente activada, descrita recientemente por Boyle y Nerbonne (1991) y Wang y cols. (1993) es todavía más cuestionable puesto que esta corriente registrada en aurícula de rata y hombre fue sensible a la 4-AP y nuestras soluciones externas siempre contuvieron 3 mM de 4-AP. Además, se añadió atropina para evitar la contribución de corriente de potasio muscarínica activada por la acetilcolina (Lefevre y cols., 1991). Consideramos el posible papel de  $I_{K,ATP}$  porque el mantenimiento durante largo tiempo del registro de *whole cell* puede reducir la sensibilidad de los canales de  $I_{K,ATP}$  al ATP (Belles y cols., 1987). Por ello estudiamos el efecto de glibencamida ( $n=4$ ), 20  $\mu M$ , en la corriente resistente a bario, la cual no resultó alterada, lo cual sugiere que la  $I_{K,ATP}$  no está implicada en esta corriente (Escande, 1989). En nuestras condiciones experimentales, en las cuales la concentración de sodio en la pipeta era de 10 mM y la externa de potasio, 4 mM, es posible que el intercambio  $Na^+/K^+$  esté activo. Para comprobar si este factor contribuía a la corriente resistente a bario, en 4 células añadimos 1  $\mu M$  de ouabaína que no alteró dicha corriente, descartando, por tanto, esta posibilidad.

También fue improbable que la corriente de fondo insensible a bario sea un artefacto debido a un cambio en la resistencia entre la pipeta y la membrana, puesto que fue observado en todas las células hipertróficas ( $n=33$ ) y nunca en las controles ( $n=21$ ).

Probamos la hipótesis de que se tratara de una corriente de cloro. En realidad, se han identificado varias corrientes de cloro en miocitos cardíacos de mamíferos (Bainski y cols., 1989; Harvey y Hume, 1989a; Zygmunt y Gibbons, WR; Sorota, 1992) y pueden



**Fig 33:** Corrientes de fondo representativas de dos células de ápex. En el panel A, un miocito aislado de un corazón control ( $C_m = 155.76$  pF), y en el B, de uno hipertrófico ( $C_m = 267.93$  pF). Las curvas corriente-voltaje fueron obtenidas en condiciones controles ( $[K^+]_o = 4$  mM, círculos rellenos) y después de la adición de  $BaCl_2$  2 mM (círculos vacíos), usando el protocolo de rampa (18.4 mV/s).



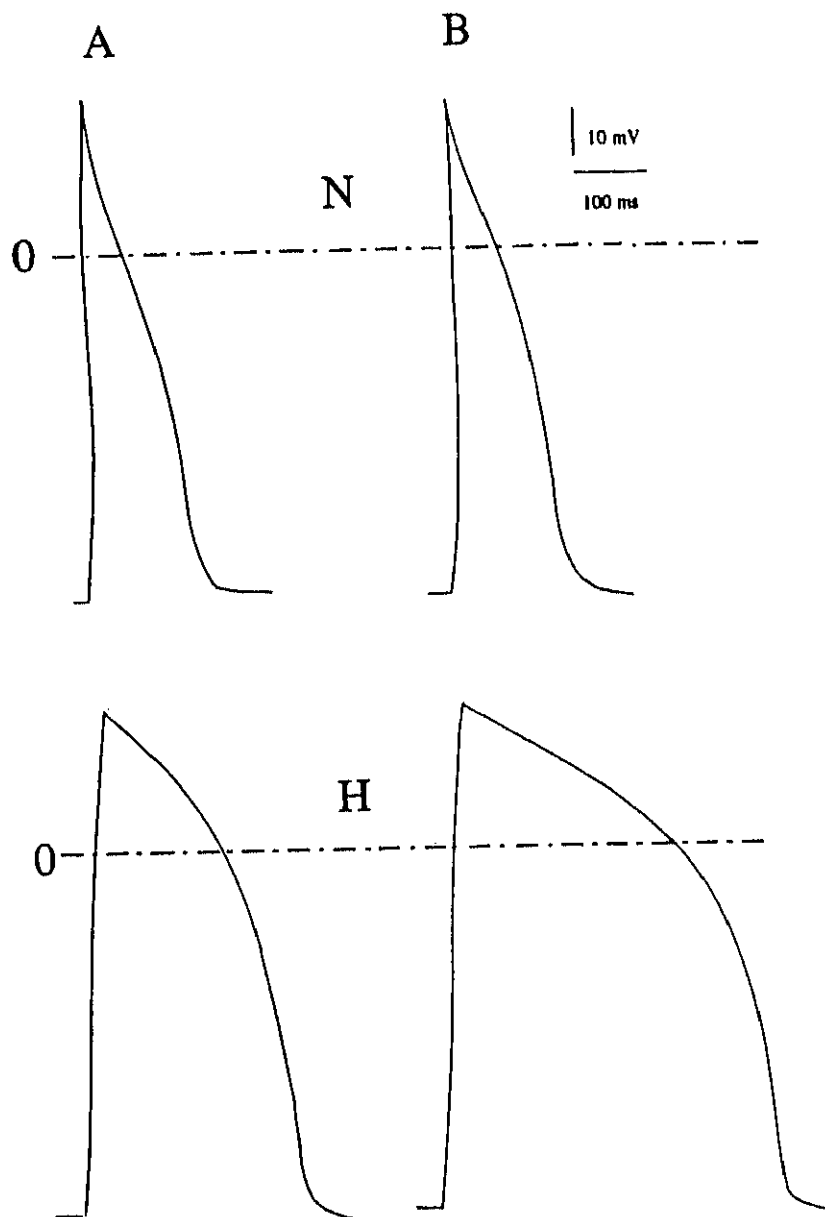
**Fig. 34:** Efecto de la adición de ácido 9 antraceno carboxílico (9-AC) en la corriente resistente a bario en un miocito aislado de la pared libre de un ventrículo izquierdo hipertrófico ( $C_m = 366.1$  pF). La curva fue obtenida en solución control con 2 mM de  $\text{BaCl}_2$  (círculos rellenos) y después de la adición de 5 mM de 9-AC (círculos vacíos), usando un protocolo de rampa de 6 s de duración, desde -100 mV hasta +70 mV, desde un potencial de membrana de -60 mV.



modular significativamente la configuración del potencial de acción (Harvey y Hume, 1989a; Harvey y cols., 1990). Aunque ningún bloqueante de cloro es específico, el 9-AC ha demostrado reducir la conductancia de cloro en algunas preparaciones cardíacas (Harvey y cols., 1990; Sorota, 1992). Por este motivo estudiamos la acción de 5 mM de 9-AC en la corriente resistente a bario evocada por una rampa de potencial desde -100 a +70 mV (28.3 mV/s), desde un voltaje de -60 mV. En la figura 34 se observa la corriente obtenida en un miocito hipertrófico de la pared libre. En condiciones controles (en presencia de 2 mM de BaCl<sub>2</sub>), la relación corriente-voltaje fue casi lineal, con una ligera rectificación de salida. La aplicación de 5 mM de 9-AC, redujo la corriente insensible a bario, tanto en la dirección de entrada como en la de salida, sin modificar el potencial de reversión (n=7: 3 septum, 2 ápex, y 2 pared libre). En nuestras condiciones experimentales, la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> era de 131 mM, y la extracelular, 148.8 mM, lo que resulta en un potencial de equilibrio para el cloro de -3.2 mV, el cual es aproximadamente 25 mV menos negativo que el observado para nuestra corriente insensible a bario (ver tabla 21). El efecto del 9-AC fue revertido después del lavado. En media, la corriente resistente a bario fue disminuida en un  $30.2 \pm 11.1$  % a -100 mV, y un  $29.9 \pm 8.3$  a +70 mV. Otro bloqueante de cloro, el ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno 2,2'-disulfónico, DIDS (Bretag, 1987), no bloqueó esta corriente a concentración de 100  $\mu$ M (n=3). La regulación de esta corriente no está resuelta. No observamos ningún efecto  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol, 1  $\mu$ M, (n=5)), ni  $\alpha$ -adrenérgica (metoxamina, 0.1 mM (n=9)) en la corriente de fondo resistente a bario que apareció en las células hipertróficas. La presencia de atropina en la solución externa excluye la modulación colinérgica.

#### 4.5.5.2.- *Contribución de la corriente sensible al ácido 9-antraceno carboxílico a la duración del potencial de acción*

Por la magnitud de la corriente sensible a 9-AC (fig 34) en las células hipertróficas, podemos suponer que tenga mayor influencia en la duración del potencial de acción en los miocitos hipertróficos que en los controles. Ésto fue probado en 10 células controles y 6 hipertróficas (ver fig. 35). Los potenciales de acción fueron evocados con pulsos estimulantes de duración de 10 ms, con una amplitud 1.5 veces la umbral de cada célula,



**Fig. 35:** Panel A: Potenciales de acción registrados en células de septum aisladas de corazones de rata normales (N) e hipertróficos (H). Panel B: Potenciales de acción registrados en las mismas células después de 3 min de exposición a 9-AC, 5 mM. El potencial de reposo de la célula normal fue de -75 mV y el de la hipertrófica, -78.5 mV. Los potenciales de reposo no variaron con la exposición a 9-AC.

a 1 Hz. Las soluciones empleadas, interna y externa fueron detalladas en la sección de métodos. Como ya observamos anteriormente, ni la amplitud del potencial de acción, ni el potencial de reposo fue diferente entre células de distintas regiones, ni fue modificado por la hipertrofia, sin embargo la duración del potencial de acción fue mayor en las células hipertróficas. El efecto del 9-AC en la duración del potencial de acción de las células controles fue insignificante, pero produjo una clara prolongación en la duración del potencial de acción a todos los niveles de repolarización en las 6 células hipertróficas estudiadas. En media, el 9-AC indujo una prolongación de la duración del potencial de acción de  $193 \pm 83$  % al 20 % de repolarización,  $122 \pm 50$  % al 50 % de repolarización, y  $74 \pm 26$  % al 90 % de repolarización. De este modo, el efecto del 9-AC fue claramente más pronunciado al principio de la repolarización del potencial de acción de los miocitos aislados de corazones de rata hipertróficos.

#### 4.5.6.- SÍNTESIS

La densidad de corriente de fondo total no es diferente en las distintas localizaciones estudiadas, ni en las células controles, ni en las hipertróficas. Sin embargo, en las células hipertróficas, la densidad de corriente de fondo total fue significativamente mayor que en las controles. Al analizar la  $I_{K1}$  (como la corriente sensible a bario), comprobamos que el aumento de la corriente de fondo total observado en las células procedentes de corazones hipertróficos no se debe a un incremento en la  $I_{K1}$ , puesto que esta corriente es similar en todas las células estudiadas.

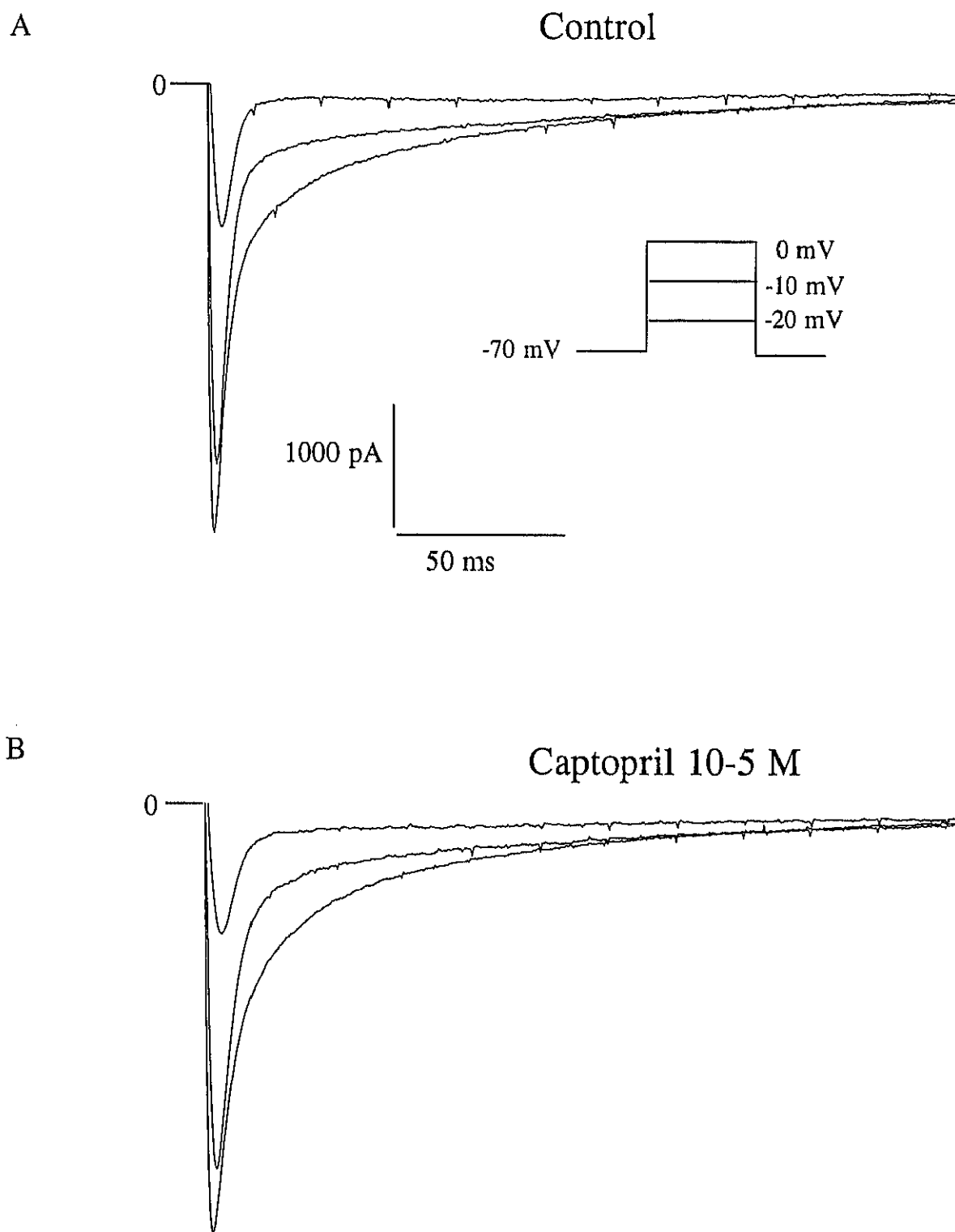
En los miocitos hipertróficos aparece una corriente de fondo insensible a bario, que es parcialmente sensible a un inhibidor de la corriente de cloro. Esta corriente tiende a acortar la duración del potencial de acción, siendo posible que sea un mecanismo compensador que evite que la duración del potencial de acción se alargue demasiado en las células de corazones hipertróficos, sobretodo en el caso de septum.

#### 4.6.- ESTUDIO DEL EFECTO DIRECTO DEL CAPTOPRIL EN LAS CORRIENTES DE MEMBRANA

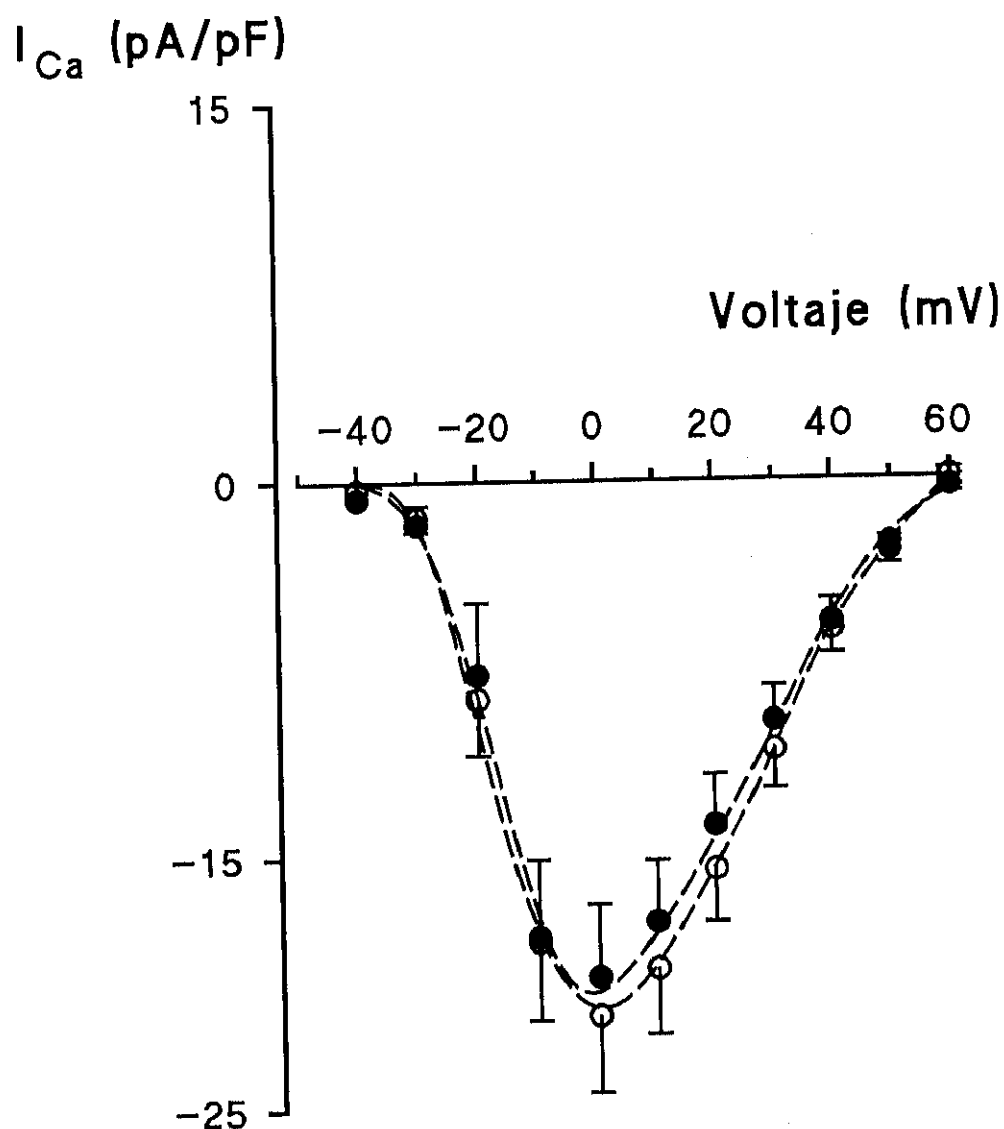
El captopril es un inhibidor del enzima de conversión de angiotensina (IECA) ampliamente prescrito para el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardíaca. Más aún, el captopril, así como otros fármacos de su grupo, son capaces de prevenir o revertir la hipertrofia cardíaca (Pfeffer y cols., 1982). Sin embargo, no se sabe si esos corazones que aparentemente son normales tras su prevención o reversión con los IECA, lo son desde el punto de vista electrofisiológico. Mucho más interesante es conocer este hecho en el caso de la prevención o reversión de la hipertrofia cardíaca a dosis no hipotensoras (Linz y cols., 1989), es decir, las características electrofisiológicas de un corazón de peso normal pero que ha estado sometido a una sobrecarga de presión. Además, dado el efecto cardioprotector de los fármacos de este grupo reduciendo las arritmias inducidas por isquemia-reperfusión (Linz y cols., 1986; Schölkens y Linz, 1990), sería probable que estos fármacos por sí mismos, tuvieran algún efecto en las corrientes de membrana. De hecho, algunos investigadores han indicado que el captopril puede reducir la corriente de calcio tipo L (Bryant y cols., 1991). Por ello creímos conveniente, antes de comenzar con el tratamiento crónico, comprobar si el captopril tiene algún efecto directo sobre las corrientes iónicas principales en la repolarización del potencial de acción cardíaco en la rata,  $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$ , e  $I_{K1}$ .

##### 4.6.1.- EFECTO SOBRE LA CORRIENTE DE CALCIO

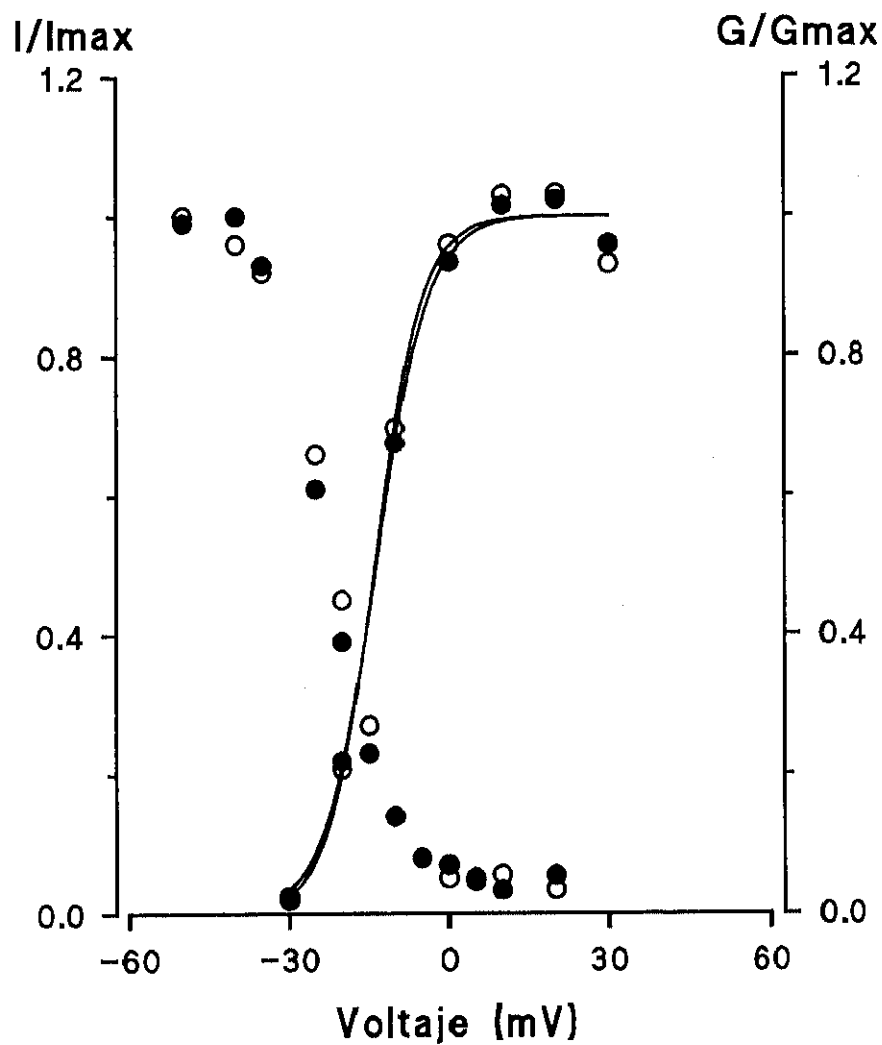
La corriente de calcio se midió en células ventriculares de rata Sprague-Dawley (300-500 g) disociadas según se explicó en la sección de métodos. El protocolo para registrar la corriente fue el mismo de otras ocasiones, esto es, desde un potencial de membrana de -70 mV, despolarizaciones de 225 ms de duración que variaron desde -50 mV hasta +60, en incrementos de 10 mV. Los protocolos para estudiar la inactivación en estado estacionario y la recuperación del estado inactivado o reactivación fueron los mismos que los utilizados en el estudio de la corriente de calcio de células controles e hipertróficas (ver sección 4.2.2). La solución externa contenía CsCl y 4-AP para bloquear



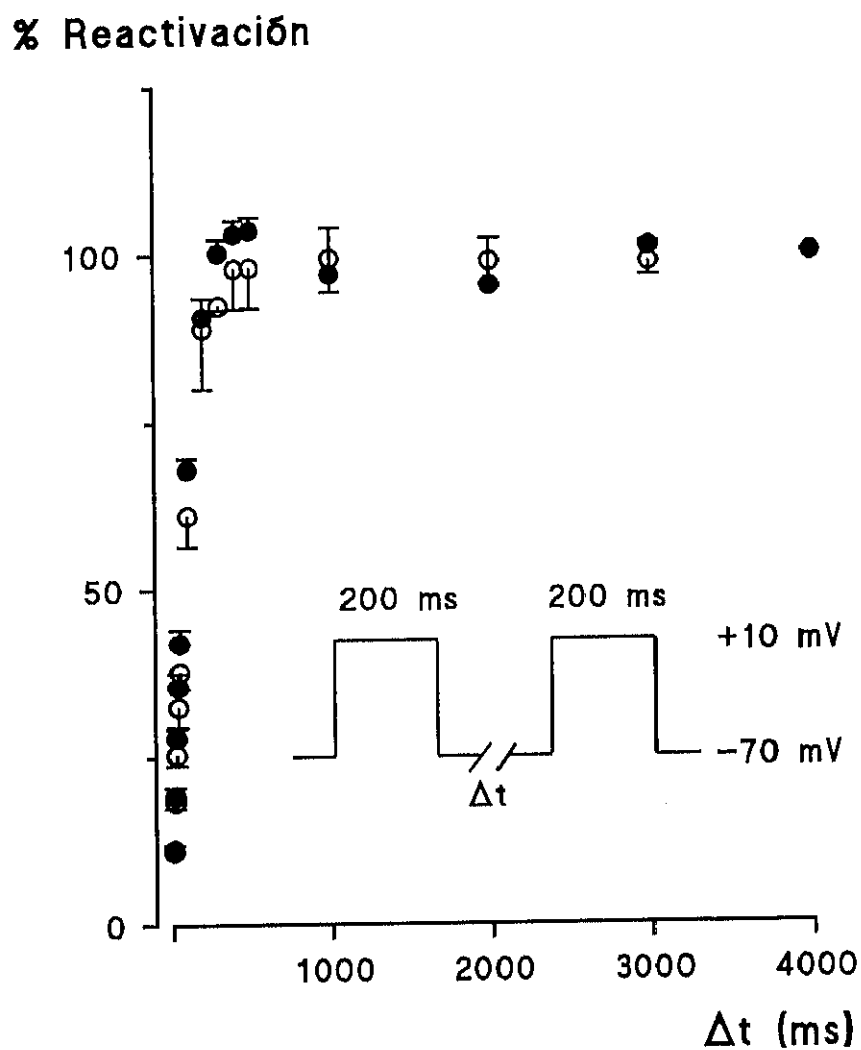
**Fig 36:** Trazos de la corriente de calcio tipo L obtenidos en la misma célula antes (A) y después (B) de la exposición a  $10^{-5}$ M de captopril.



**Fig 37:** Relación densidad de corriente-voltaje de la corriente de calcio tipo L antes (círculos blancos) y después (círculos negros) de la presencia de  $10^{-5}M$  de captopril. Los puntos representan la medias y las líneas verticales, el ESM.



**Fig. 38:** Ejemplo representativo del efecto del  $10^{-5}M$  en la dependencia del voltaje de la activación e inactivación en estado estacionario de una célula ventricular de rata. Los círculos blancos representan los valores en situación control y los negros, los obtenidos tras la perfusión con  $10^{-5}M$  de captopril.



**Fig. 39:** Reactivación de la  $I_{Ca}$  en 5 células ventriculares de rata, en solución control (círculos blancos) y en presencia de  $10^{-5}M$  de captopril (círculos negros). Los puntos representan las medias y las barras ESM. Protocolo en el interior de la figura.



las corrientes de potasio, y en la solución interna también había CsCl con el mismo fin (ver sección soluciones en métodos). En estas condiciones se grabó la  $I_{Ca}$ , y a continuación se perfundieron las células con una solución similar a la anterior, pero a la que se le había añadido  $10^{-5}$  M de captopril, y se volvió a repetir el protocolo, después se repitió de nuevo retirando el fármaco del medio externo.

En nuestras condiciones experimentales la perfusión con captopril no varió significativamente ni la amplitud de la  $I_{Ca}$  (fig. 36), ni su dependencia del voltaje (fig. 37). La activación en estado estacionario no varió ni tampoco la inactivación en estado estacionario (ver tabla 22, y fig. 38). La recuperación de la inactivación tampoco se vio afectada por el captopril (fig. 39).

**Tabla 22:** Parámetros de la activación e inactivación en estado estacionario en situación control y en presencia de  $10^{-5}$ M de captopril.

	ACTIVACIÓN $I_{Ca}$ (n = 5)		INACTIVACIÓN $I_{Ca}$ (n = 6)	
	$V_{50}$	k	$V_{50}$	k
CONTROL	$-13.5 \pm 1.2$	$5.7 \pm 0.5$	$-22.1 \pm 0.8$	$-6.0 \pm 0.2$
Capt $10^{-5}$ M	$-15.3 \pm 1.5$	$4.3 \pm 0.2$	$-20.3 \pm 1.3$	$-5.7 \pm 0.4$

$V_{50}$ , potencial al cual la activación o la inactivación es el 50 % de la máxima. k, pendiente de la curva de activación o de inactivación. Los datos son medias  $\pm$  ESM.

#### 4.6.2.- EFECTO SOBRE LA CORRIENTE TRANSITORIA DE SALIDA

Puesto que la  $I_{to}$  es la corriente que resulta afectada por la hipertrofia, la utilizaremos para determinar si los corazones después de un tratamiento crónico con captopril muestran las características de la hipertrofia o por el contrario, son normales desde este punto de vista. Por ello, es necesario saber si el captopril ejerce algún efecto directo sobre esta corriente.

La  $I_{to}$  se midió en células aisladas del ventrículo izquierdo de corazones de rata Sprague-Dawley (350-500 g), disociadas según se explicó en la sección de métodos. El protocolo para el análisis de la corriente fue el mismo que el utilizado en la sección 4.3.2, la solución externa contenía colina en lugar de sodio, para evitar la corriente  $I_{Na}$  y cobalto para bloquear la corriente de calcio (ver soluciones). Primero perfundimos las células con esta solución control y registramos la  $I_{to}$ , luego repetimos el protocolo en presencia de  $10^{-5}$  M de captopril disuelto en la misma solución, y por último retiramos el fármaco y lo volvimos a repetir, para ver si en el caso de obtener algún efecto, resultaba revertido. Aunque el efecto del captopril se probó en células de todas la localizaciones, preferimos utilizar células del ápex y la pared libre, que por presentar mayor  $I_{to}$ , se vería más claro un posible efecto, y puesto que no utilizamos 4-AP, se cometen menos errores en la medición. La solución interna, por ello, contenía mayor cantidad de EGTA de lo habitual, en este caso 10 mM, para evitar la posible activación del componente de la corriente transitoria activada por calcio intracelular (a pesar de que no se ha visto que este componente exista en la rata (Apkon y Nerbonne, 1991)).

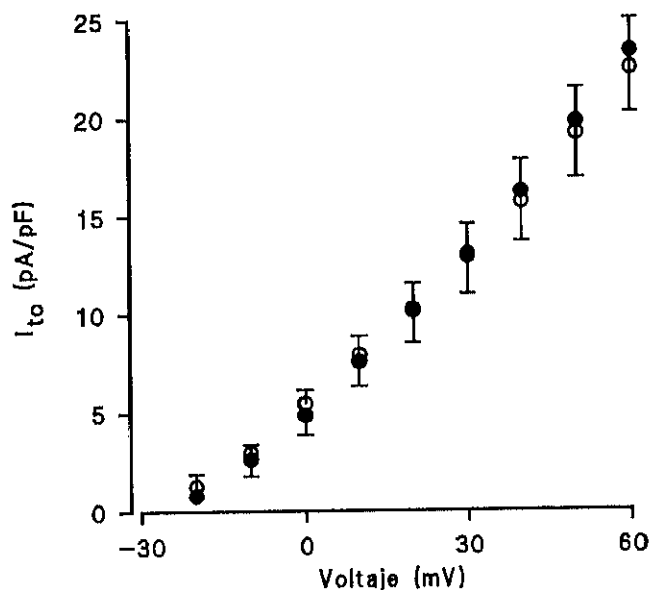
En estas condiciones, el captopril no modificó la amplitud de  $I_{to}$  (fig 40). La cinética de la corriente transitoria de salida de potasio tampoco resultó alterada significativamente, ni la dependencia del voltaje de la activación (fig. 41 A), ni la inactivación (fig 41 B) en estado estacionario. Los parámetros medios se resumen en la tabla 23. Tampoco la reactivación fue modificada por la presencia de captopril (fig 42).

**Tabla 23:** Parámetros de la activación e inactivación en estado estacionario de la  $I_{to}$  en situación control y en presencia de captopril,  $10^{-5}$  M.

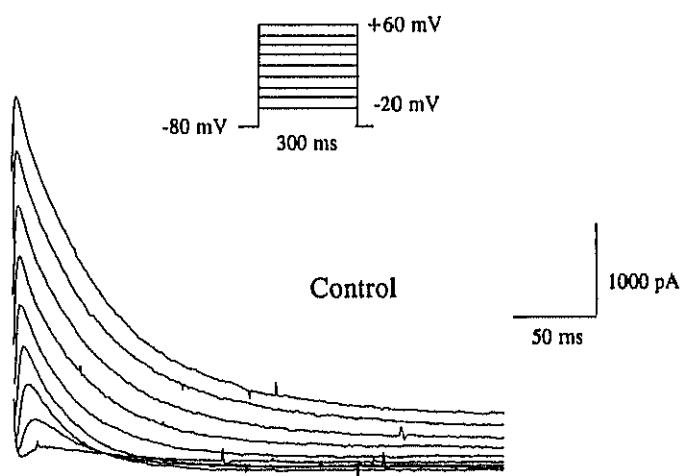
	ACTIVACIÓN $I_{to}$ (n=4)		INACTIVACIÓN $I_{to}$ (n=4)	
	$V_{50}$	$k$	$V_{50}$	$k$
CONTROL	$12.4 \pm 1.3$	$18.3 \pm 0.8$	$-38.1 \pm 1.8$	$-5.9 \pm 0.4$
Capt $10^{-5}$ M	$12.3 \pm 1.3$	$16.5 \pm 0.7$	$-35.4 \pm 1.8$	$-5.7 \pm 0.7$

$V_{50}$ , voltaje al cual la activación o la inactivación es el 50 % de la máxima.  $k$ , pendiente de la curva de activación o inactivación.

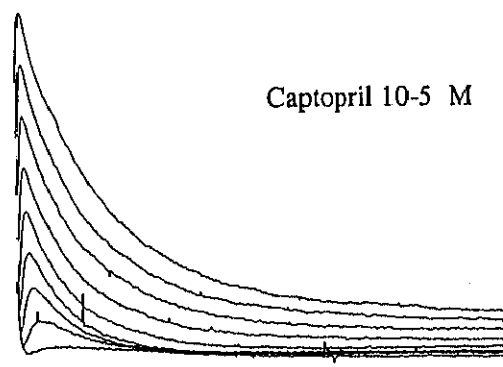
A



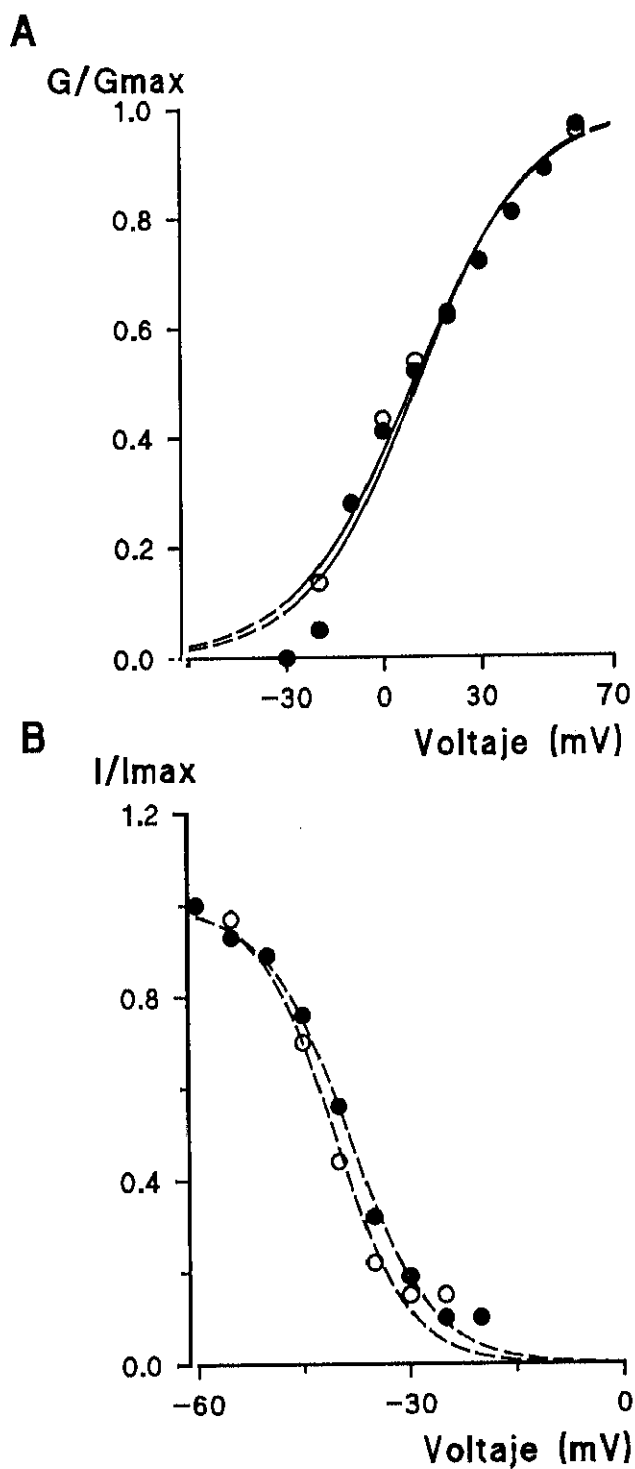
B



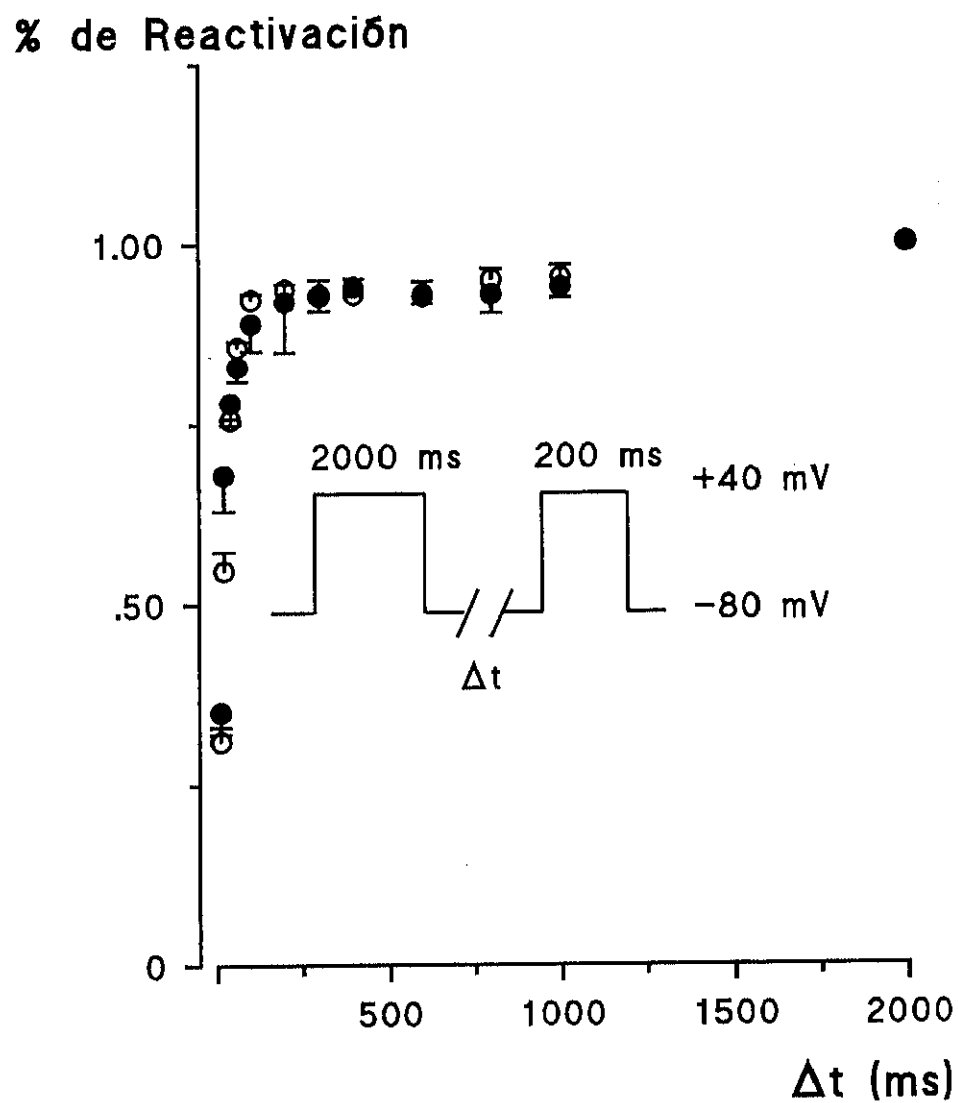
C



**Fig. 40:** A, Efecto del captopril en la relación densidad de corriente-voltaje de la corriente transitoria de salida, en 5 células apicales, en situación control (círculos blancos) y tras la exposición a  $10^{-5}$ M de captopril (círculos negros). Los círculos expresan las medias y las líneas verticales el ESM. En la parte inferior se presentan los trazos obtenidos de la  $I_{to}$  en una célula de la pared libre izquierda antes (B) y después (C) de la adición de  $10^{-5}$ M de captopril en el líquido de perfusión.



**Fig. 41:** Ejemplo del efecto del captopril ( $10^{-5}M$ ) sobre las curvas de activación (**A**) e inactivación (**B**) en estado estacionario, de la  $I_{to}$ , en una célula de la pared libre izquierda. Los puntos blancos representan los valores obtenidos en situación control, y los puntos negros representan los valores obtenidos tras la exposición de la célula al captopril.



**Fig. 42:** Efecto del captopril,  $10^{-5}M$ , en la reactivación de la  $I_{to}$  en ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) del fármaco en el líquido de perfusión. El protocolo se muestra en el interior de la figura. Los puntos y las barras verticales indican medias  $\pm$  ESM.

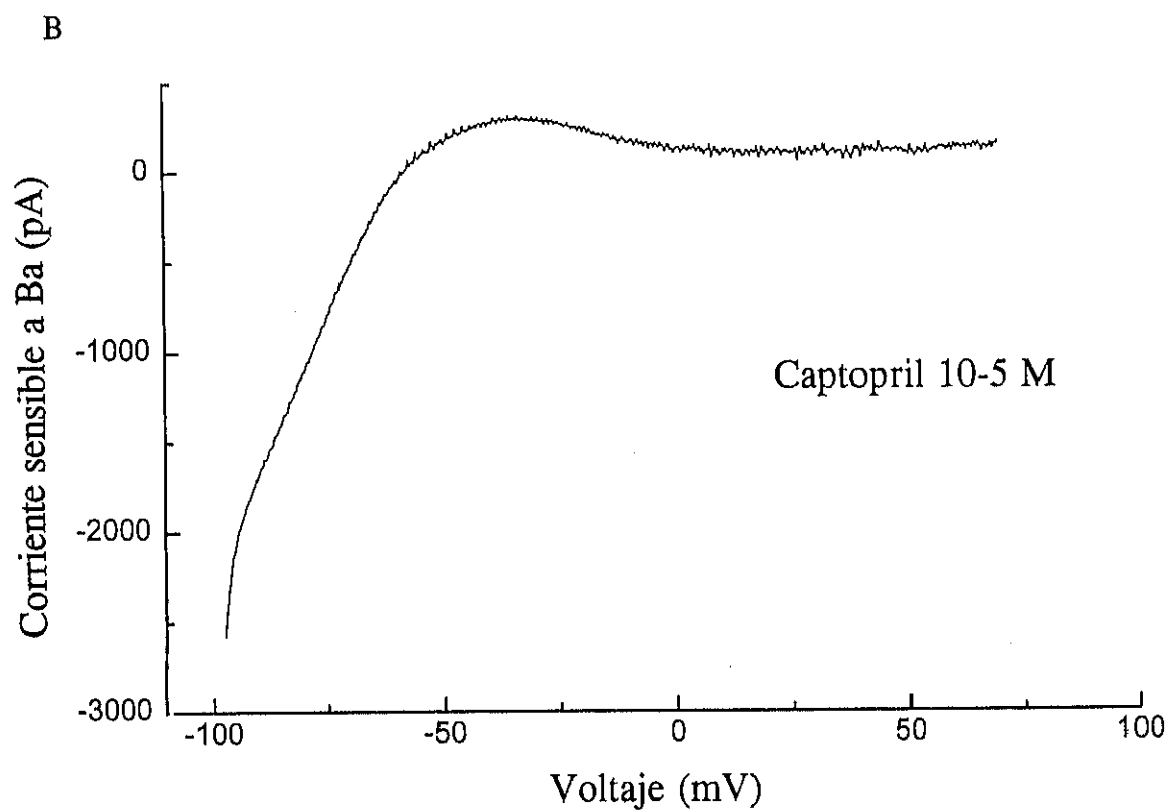
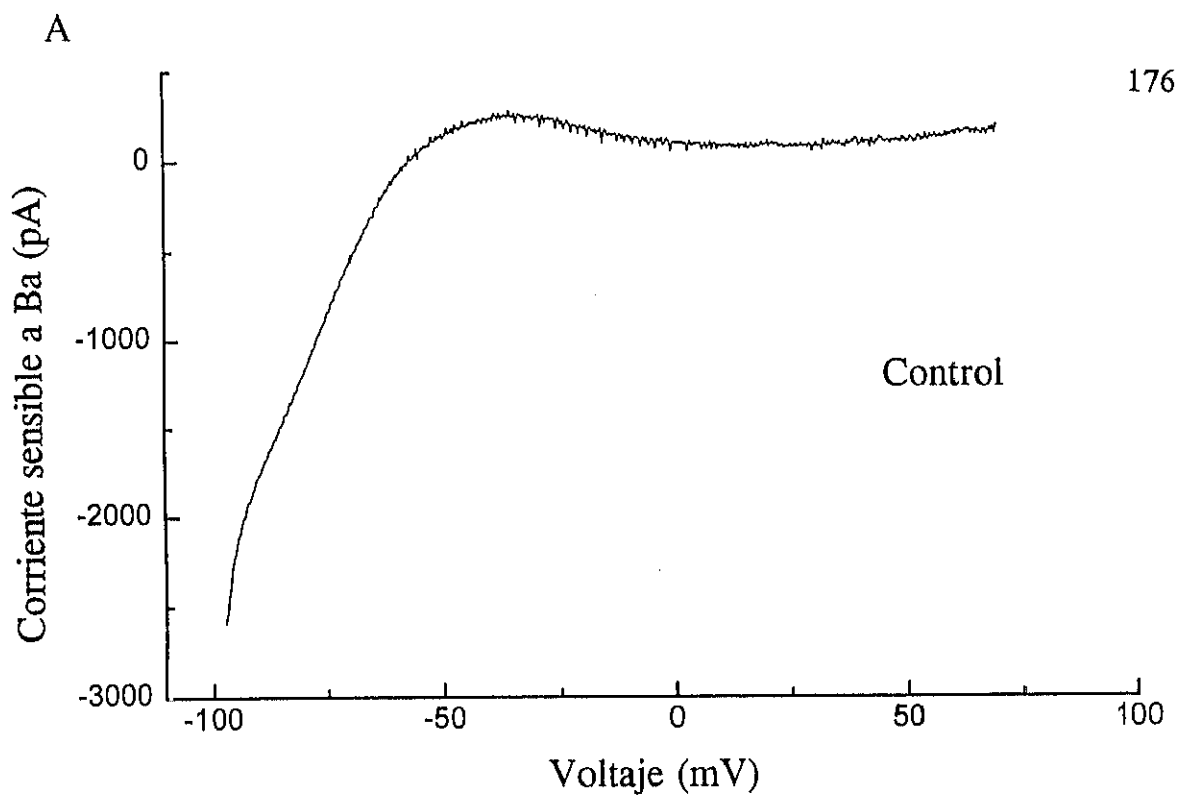


Fig. 43: Ejemplo representativo del registro de la  $I_{K1}$  en situación control (A) y tras la perfusión con  $10^{-5}$ M de captopril (B).

#### 4.6.3.- EFECTO EN LA CORRIENTE DE RECTIFICACIÓN DE ENTRADA

El protocolo utilizado para estudiar el posible efecto del captopril en la  $I_{K1}$ , fue una rampa de voltaje, desde -100 mV a +70 mV (28 mV/s). Las soluciones empleadas fueron las mismas que en anteriores ocasiones (ver sección soluciones). En las condiciones que utilizamos, la corriente  $I_{K1}$  registrada antes y después de la perfusión de la célula con captopril,  $10^{-5}M$ , fue idéntica, es decir, el captopril no modificó la corriente  $I_{K1}$  (ver fig 43).

#### 4.6.4.- SÍNTESIS

Los estudios del efecto directo del captopril sobre las corrientes  $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$  e  $I_{K1}$ , han mostrado que este fármaco carece de efecto directo en estas corrientes. Este hecho excluye un efecto directo antiarrítmico considerando estas corrientes, y también excluye un efecto arritmogénico, ya que cabría esperar que no modifique la duración del potencial de acción cardíaco.

A la vista de estos resultados, podemos estudiar la corriente  $I_{to}$  tras el tratamiento crónico con captopril, descartando un efecto directo de este fármaco, en caso de encontrar alguna variación en esta corriente.

#### 4.7.- TRATAMIENTO CRÓNICO CON CAPTOPRIL

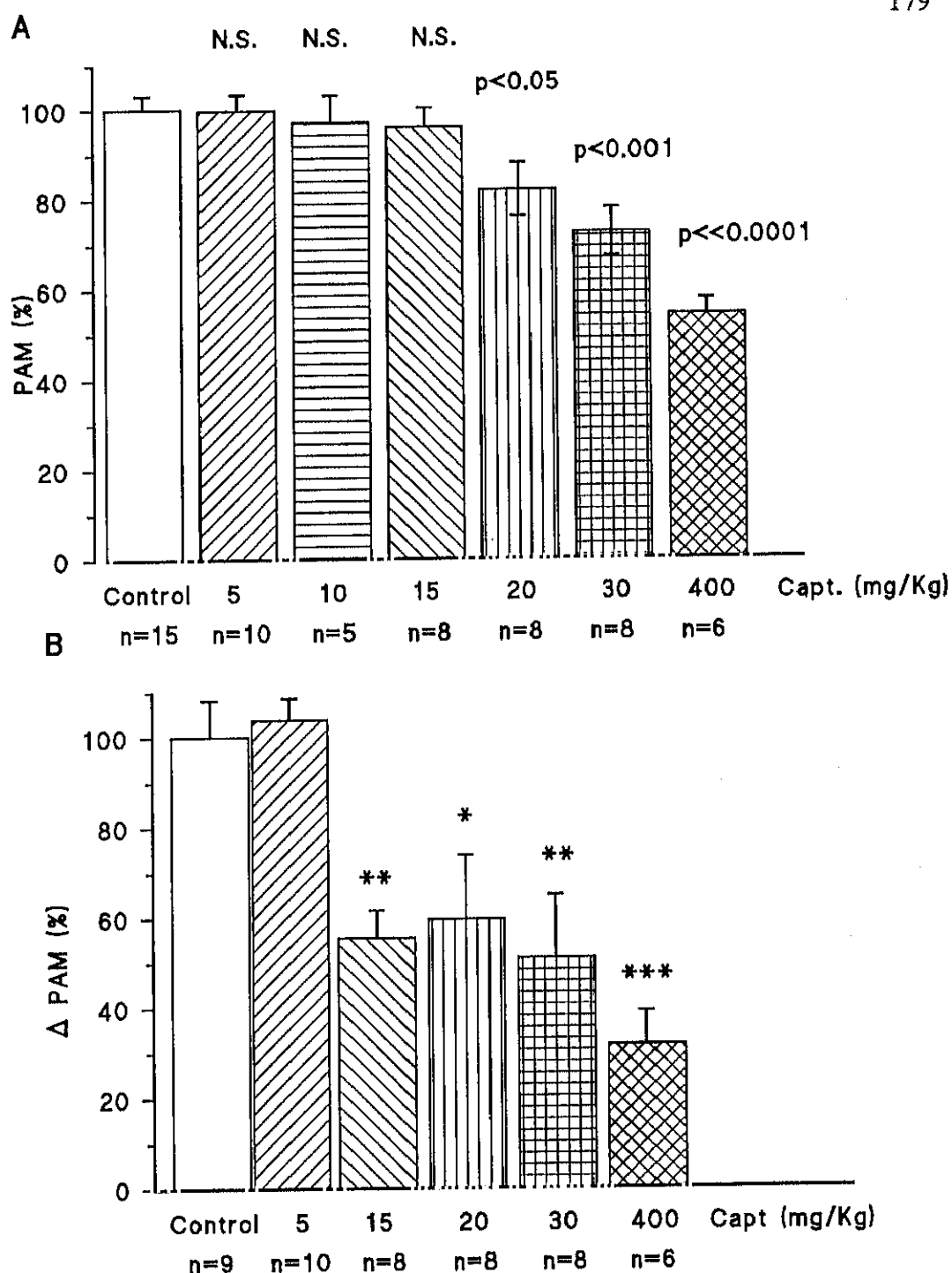
En el estudio del tratamiento crónico con captopril, nuestros objetivos principales fueron dos: 1) basándonos en el ratio peso corazón/peso corporal y en las capacitancias celulares, probar si el captopril era capaz de prevenir el desarrollo de la hipertrofia cardíaca a dosis no hipotensoras, pero que inhiban significativamente el ECA (Linz y cols., 1989a) y estudiar la  $I_{to}$  en los miocitos de estos corazones; y 2) realizar un tratamiento crónico con una dosis de captopril que ha probado ser capaz de prevenir el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Pfeffer y cols., 1982), con el fin de determinar si su corriente transitoria de salida de potasio corresponde a la de un corazón normal o no.

##### 4.7.1.- ESTUDIOS PRELIMINARES

Para determinar la dosis no hipotensora capaz de inhibir significativamente el ECA, tratamos ratas macho Sprague-Dawley (300-500 g) durante 4-6 días con distintas dosis de captopril disueltas en el agua de bebida, y medimos la presión arterial en carótida (ver sección métodos), y la respuesta presora a AT I (1  $\mu$ g/Kg, intravenosa), como medida indirecta de la actividad del enzima. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos en ratas del mismo peso y edad que no habían recibido fármaco.

La presión arterial fue medida en 59 ratas que habían recibido o no diferentes dosis de captopril disueltas en el agua de bebida. Las dosis que probamos fueron (en mg/Kg/día): 5 (n=10), 10 (n=4), 15 (n=8), 20 (n=8), 30 (n=8), 400 (n=6). Como controles utilizamos 15 ratas que no habían recibido captopril. Los resultados están representados en la figura 44, como porcentaje de la presión arterial media en situación control. Las ratas que no habían recibido captopril tuvieron una presión arterial media de  $126.19 \pm 3.9$  mm de Hg, datos muy similares a los encontrados por otros investigadores en ratas de esta misma raza (Linz y cols., 1991), la dosis más alta que no disminuyó significativamente la presión arterial fue la de 15 mg/Kg/día, las ratas tratadas con esta dosis presentaron una presión de  $121.0 \pm 5.4$  mm de Hg, dosis mayores indujeron una caída en la presión arterial que fue dosis-dependiente. Seguidamente medimos el





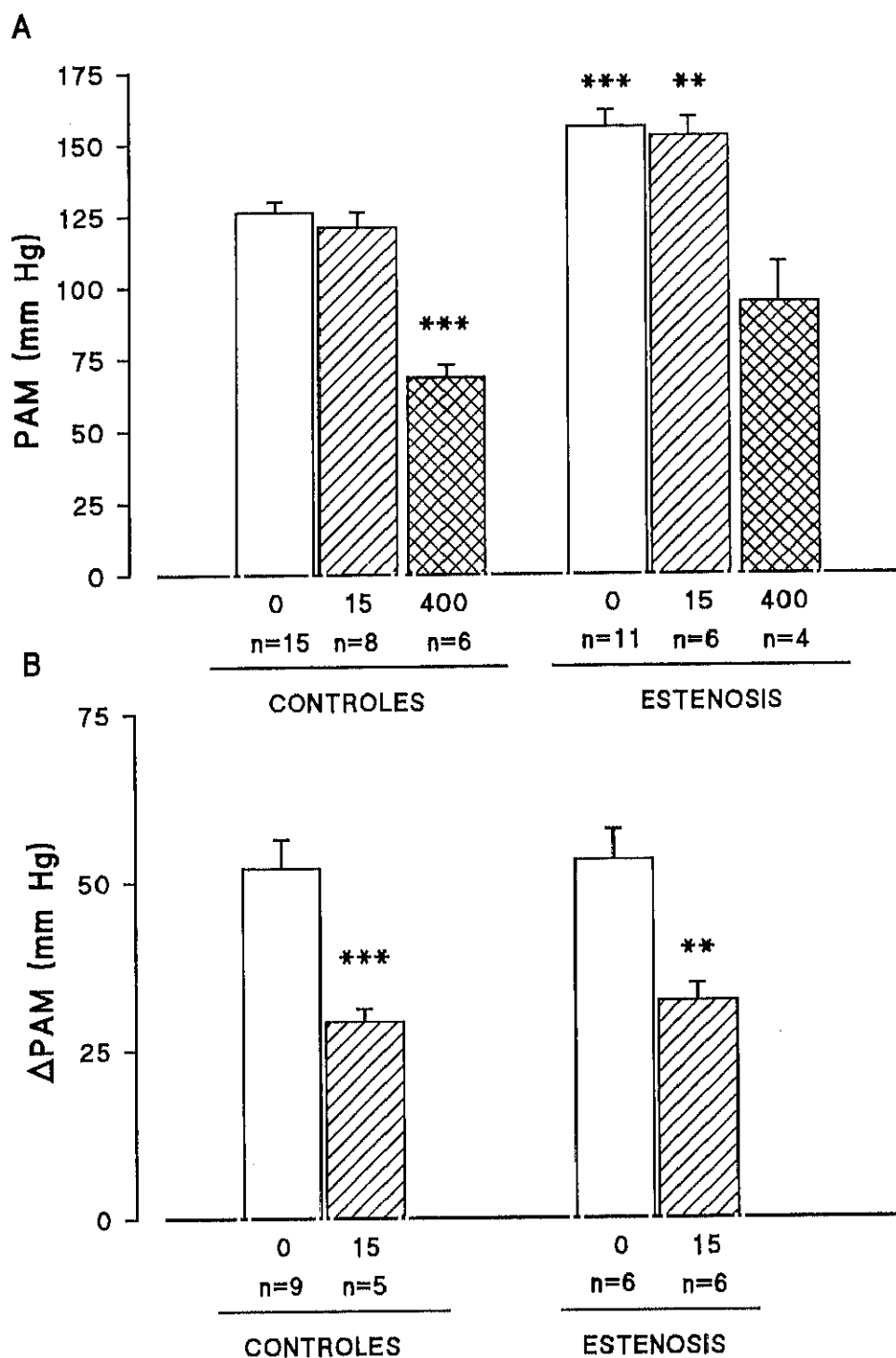
**Fig. 44.:** A, Efecto del tratamiento con distintas dosis de captopril, durante 4-6 días, sobre la presión arterial media. El 100% corresponde a los valores de presión en las ratas controles, que no recibieron fármaco en su agua de bebida. B, incremento en la presión arterial media, como respuesta a la administración i.v de angiotensina I, en relación al aumento en las ratas que no recibieron fármaco; Capt., captopril; \*,  $p < 0.005$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ . Las líneas verticales en cada histograma expresan el ESM.

incremento de la presión arterial media, inducido por la administración intravenosa de AT I ( $1 \mu\text{g/Kg}$ ). Esto lo utilizamos como una forma indirecta de medir la actividad del ECA, puesto que el aumento conseguido en la presión arterial, está determinado por la conversión de AT I a AT II, ya que es esta última la que ejerce una acción presora (Baker y cols., 1990). Los resultados obtenidos nos indicaron que para la dosis de  $15 \text{ mg/Kg/día}$ , ya había una diferencia significativa en la acción presora de la AT I (ver fig 44 B), así pues, elegimos esta dosis por ser la que no alteraba la presión arterial basal, pero sí producía una inhibición importante del ECA.

#### 4.7.2.- TRATAMIENTO CRÓNICO

Para estudiar el efecto de las dosis de captopril elegidas ( $15 \text{ mg/Kg}$  y  $400 \text{ mg/Kg}$ ), utilizamos ratas macho Sprague-Dawley ( $180\text{-}200 \text{ g}$ ), a las que dividimos en dos grupos, a uno de ellos se le operó para colocarle un clip en la aorta abdominal, y al segundo se le operó, pero no se le colocó ningún clip (ver sección métodos). El grupo de animales que sufrieron constricción aórtica, se subdividió en tres grupos: al primero de ellos no se le dió tratamiento alguno, al segundo se le administró  $15 \text{ mg/Kg/día}$  de captopril y al tercero  $400 \text{ mg/Kg/día}$  de dicho fármaco, el cual se disolvió en el agua de bebida de los animales. Diariamente se midió el agua consumida, se pesaron semanalmente, y semanalmente también, se ajustó la dosis.

Los animales fueron sacrificados a las 6-7 semanas, tiempo al cual los corazones fueron extraídos, pesados para determinar el ratio peso corazón/peso corporal, y utilizados para la obtención de los miocitos aislados, en los cuales estudiamos la  $I_{\text{to}}$ . Para asegurarnos de que después de 6-7 semanas de tratamiento, tanto las dos dosis de captopril, como la constricción aórtica estaban funcionando, algunos de los animales del estudio fueron empleados para medir sus presiones arteriales. Excepcionalmente, algunos de los animales utilizados para la medición de la presión arterial, se utilizaron después para su estudio electrofisiológico. Los resultados obtenidos nos indicaron que tanto el grupo con constricción aórtica control (sin recibir captopril) como el grupo con constricción aórtica y la dosis baja de captopril, tenían la presión significativamente más alta en carótida



**Fig. 45:** Histogramas representando el efecto del tratamiento con distintas dosis de captopril en la presión arterial media (A), y en el incremento en la presión arterial media inducido por la administración intravenosa de 1  $\mu\text{g/Kg}$  de angiotensina I (B), en ratas controles y en ratas con constricción aórtica. \*,  $p < 0.02$ ; \*\*,  $p < 0.002$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Los números debajo de cada barra, indica la dosis de captopril en mg/kg/día. Las líneas verticales expresan los SEM.

que la de los otros dos grupos ( $156.0 \pm 5.8$  mm Hg y  $152.8 \pm 6.6$  mm Hg en animales con constricción aórtica sin tratamiento ( $n=11$ ) y recibiendo 15 mg/Kg de captopril ( $n=6$ ) respectivamente, frente a  $126.2 \pm 3.9$  mm Hg en 15 animales controles y  $121.0 \pm 5.4$  en 8 animales sin constricción aórtica tratados con 15 mg/kg de captopril; ver fig. 45 A), esto nos indicó que la dosis baja del fármaco, no sólo no modificó una presión normal, sino que tampoco disminuyó una presión elevada. Sin embargo, el ECA estaba marcadamente inhibida, como lo indica el hecho de que la respuesta presora a la AT I fue significativamente menor que en los grupos controles (el incremento en la presión arterial media tras la administración de 1  $\mu$ g/Kg de AT I, en mm de Hg, fue:  $52.07 \pm 4.3$  y  $53.17 \pm 4.5$  en 9 ratas controles y 6 hipertróficas respectivamente, sin recibir tratamiento alguno; y  $29.2 \pm 1.9$  y  $32.1 \pm 2.6$  en animales que habían recibido 15 mg/Kg de captopril, sin ( $n=5$ ) o con ( $n=6$ ) constricción aórtica, respectivamente; fig. 45 B). Por el contrario, la dosis más alta de captopril, sí mostró un efecto hipotensor ( $126.2 \pm 3.9$  mm de Hg en ratas controles ( $n=15$ ), frente a  $68.3 \pm 4.4$  mm de Hg en 6 animales tratados con 400 mg/Kg de captopril). Las ratas con estenosis aórtica que recibieron la dosis hipotensora de captopril no mostraron una presión arterial media diferente de las ratas controles ( $126.2 \pm 3.9$  mm de Hg en ratas controles ( $n=15$ ), y  $94.5 \pm 14.1$  en animales con estenosis aórtica y 400 mg/Kg del fármaco,  $p > 0.05$ ).

#### 4.7.3.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Como en resultados anteriores, los animales con constricción aórtica desarrollaron una hipertrofia cardíaca, hecho que se puso de manifiesto por su elevado ratio peso corazón/peso corporal comparado con el obtenido en animales controles ( $4.8 \pm 0.1$  mg/g en 19 animales hipertróficos, frente a  $3.5 \pm 0.07$  mg/g en 17 controles,  $p \ll 0.0001$ ) (ver tabla 24). La dosis no hipotensora de captopril no previno el desarrollo de hipertrofia en la mayoría de los animales ( $4.8 \pm 0.2$  mg/g ( $n=11$ ),  $p \ll 0.0001$  con respecto a los animales controles y no significativo con respecto a los hipertróficos), sin embargo, en 5 ratas del grupo de 16, los ratios peso corazón/peso animal no alcanzaron el nivel del 30 % de aumento (criterio que habíamos utilizado anteriormente para determinar la presencia

de hipertrofia), por lo que les consideramos un grupo aparte, sin embargo, a pesar de no alcanzar un 30 % de incremento con respecto a los controles (en media mostraban

**Tabla 24:** Características de los animales en los distintos grupos estudiados.

	Peso corporal (g)	Peso corazón (g)	Ratio (mg/Kg) corazón/cuerpo
CONTROL n=17	485.7 $\pm$ 11.5	1.7 $\pm$ 0.04	3.5 $\pm$ 0.07
HIPERTROFIA n=19	442.8 $\pm$ 20.6	2.1 $\pm$ 0.10	4.8 $\pm$ 0.10
15 mg/kg/día (R > 30%) n=11	438.6 $\pm$ 21.7	2.1 $\pm$ 0.10	4.8 $\pm$ 0.20
15 mg/kg/día (R < 30%) n=5	437.8 $\pm$ 24.4	1.8 $\pm$ 0.10	4.1 $\pm$ 0.06
400 mg/Kg/día n=5	340 $\pm$ 28.3	1.32 $\pm$ 0.12	3.8 $\pm$ 0.05

Todos los animales tratados tenían constricción aórtica.  $R > 6 < 30\%$ , ratio peso corazón/peso corporal,  $> 6 <$  del 30 % del ratio de las ratas controles. Los valores están expresados como media  $\pm$  ESM.

aproximadamente un 17 % de aumento). El ratio de este subgrupo de animales fue de  $4.1 \pm 0.06$  mg/g, lo cual es superior al encontrado en los animales controles ( $p < 0.0001$ ), e inferior ( $p \ll 0.0001$ ) al obtenido en animales hipertróficos. Debemos recordar que sus presiones no fueron diferentes de los animales que desarrollaron hipertrofia. Por el contrario, en el 100 % de los animales que recibieron la dosis alta de captopril, se previno la aparición de la hipertrofia cardíaca (ratio  $3.8 \pm 0.05$ ,  $p \ll 0.0001$  comparado con el de animales hipertróficos). Sin embargo, este grupo de animales creció significativamente menos ( $p < 0.02$ ) y sus corazones también fueron significativamente más pequeños ( $p < 0.05$ ).

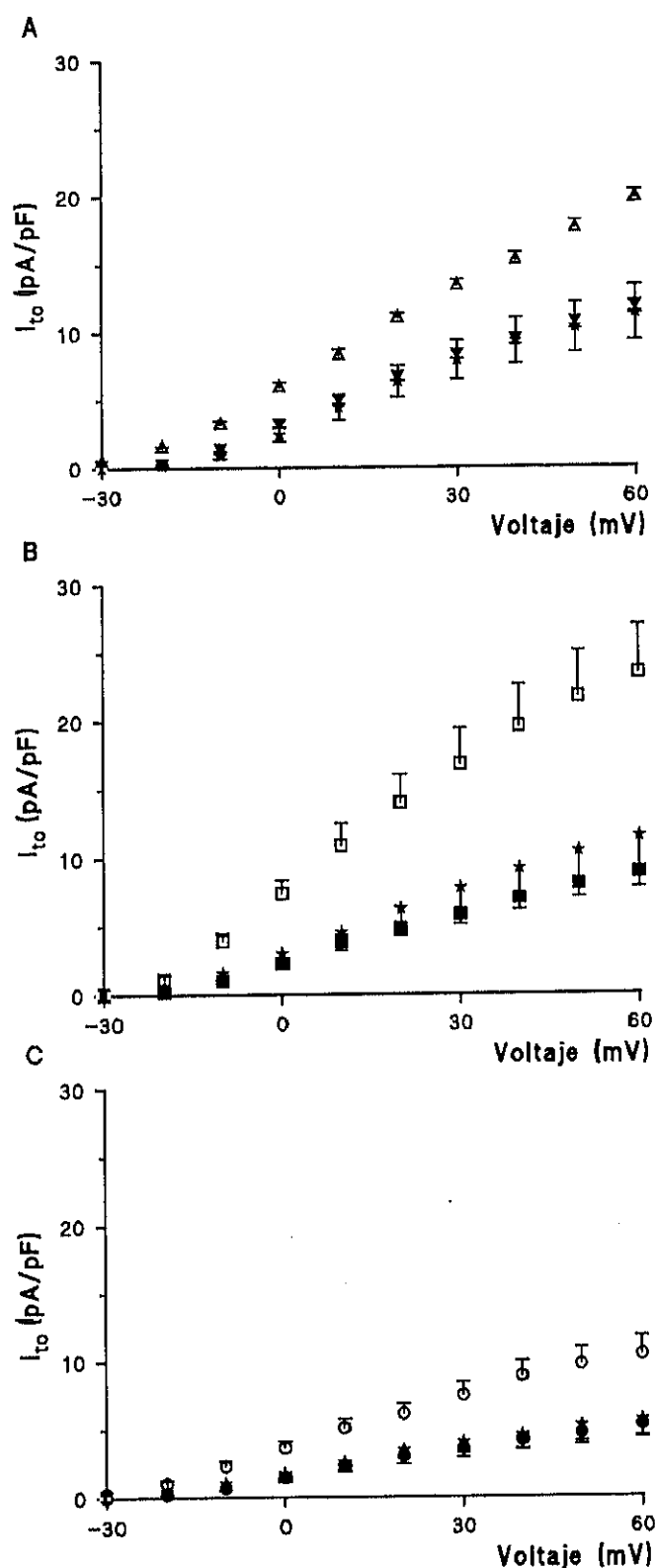
#### 4.7.4.- CARACTERÍSTICAS DE LA CORRIENTE TRANSITORIA DE SALIDA

##### 4.7.4.1.- *Dosis no hipotensora*

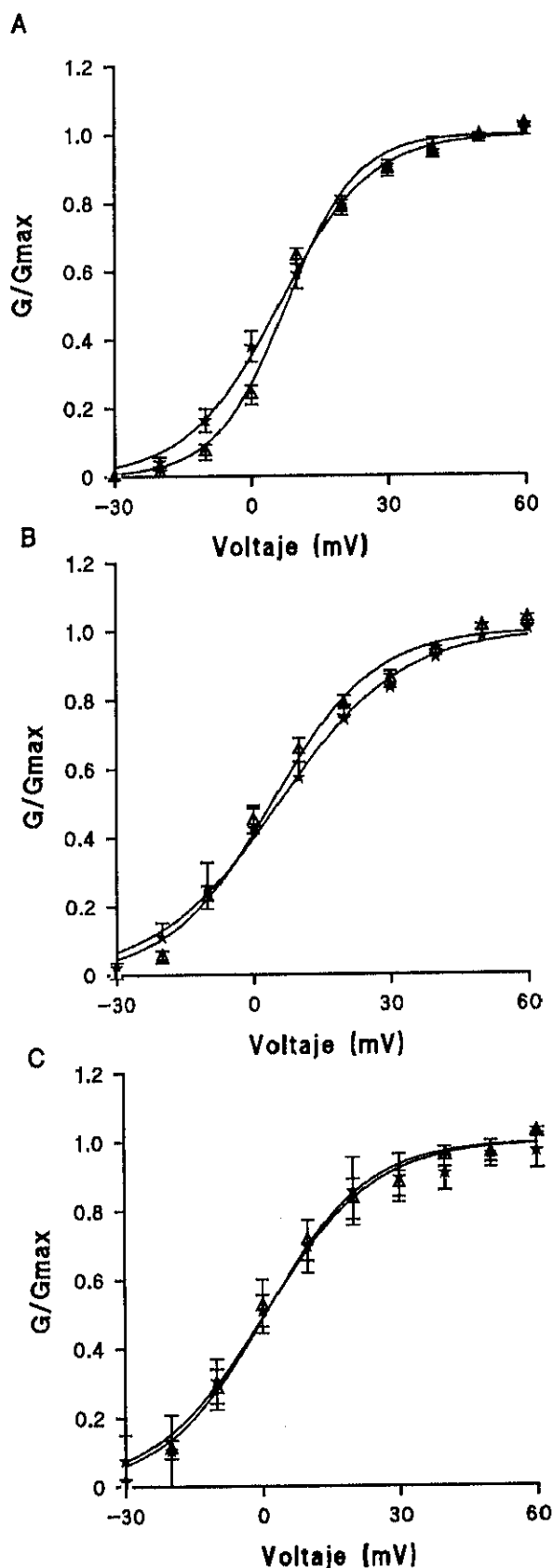
Las células procedentes de los animales tratados con una dosis no hipotensora, cuyo ratio peso corazón/peso corporal fue considerado hipertrófico, presentaron unas capacitancias de membrana mayores de las células aisladas de animales controles ( $297.7 \pm 27.7$  pF (n=21), versus  $180.0 \pm 8.2$  pF respectivamente (n=35),  $p < 0.01$ ), y no significativamente diferentes de las capacitancias de los miocitos aislados de corazones hipertróficos sin tratar ( $251.4 \pm 13.2$  pF, n=31), indicando que estos animales presentaban hipertrofia a nivel celular (tabla 25).

En la figura 46, se representan las densidades de  $I_{to}$  en función del potencial test. La corriente fue registrada como en anteriores ocasiones (ver sección de  $I_{to}$  en células controles e hipertróficas), y se analizó de la misma manera, es decir, analizando la corriente sensible a 4-AP. Como puede observarse en dicha figura y en los datos de la densidad de  $I_{to}$  registrados a +60 mV expuestos en la tabla 25, en las células de las tres regiones estudiadas, la densidad de  $I_{to}$ , fue similar en las células del grupo tratadas con la dosis no hipotensora de captopril que en las hipertróficas sin tratar, y menores que las células controles. Otros parámetros de la  $I_{to}$ , como la dependencia del voltaje de su activación en estado estacionario, tampoco fue diferente de las células hipertróficas (fig. 47, tabla 25).

En los animales que no alcanzaron el nivel que habíamos predeterminado (del 30 % de incremento con respecto a los controles) como indicador de la presencia de hipertrofia cardíaca (Scamps y cols., 1990), estudiamos la  $I_{to}$  en las células de ápex, y encontramos que la densidad de corriente no fue significativamente diferente de la encontrada en células hipertróficas (a un potencial de +60 mV, en pA/pF:  $10.49 \pm 2.64$  (n=8), versus  $12.03 \pm 0.72$  (n=7) en células de corazones tratados e hipertróficos sin tratar, respectivamente). Estos resultados indican que a pesar del menor ratio,



**Fig. 46:** Densidad de  $I_{to}$  en células aisladas de corazones controles (triángulos blancos) e hipertróficos sin tratamiento, (triángulos negros) y de corazones de ratas que han recibido un tratamiento de 15 mg/Kg/día de captopril, desde el segundo día posterior a la constricción aórtica, cuyo ratio peso corazón/peso corporal superaba el 30 % del de los animales controles (estrellas). Las células procedían de ápex (A), pared libre izquierda (B), y septum interventricular (C). Las líneas verticales indican ESM.



**Fig. 47:** Curvas de activación en estado estacionario respecto al voltaje, en células de ápex (A), pared libre (B), y septum (C) aisladas de corazones hipertróficos sin tratamiento (triángulos negros) y de corazones de ratas que han recibido un tratamiento de 15 mg/Kg/día de captopril, desde el segundo día posterior a la constricción aórtica, cuyo ratio peso corazón/peso corporal superaba el 30 % del de los animales controles (estrellas). La curva es la ecuación de boltzmann que mejor se ajusta a los puntos. Las líneas verticales indican ESM.



estas células no son normales desde un punto de vista electrofisiológico, y tomando como criterio la densidad de  $I_{to}$ , podemos afirmar que las células aisladas de los corazones que han estado sometidos a una sobrecarga de presión, tanto si no han estado tratadas, como si lo han estado con una dosis no hipotensora de captopril, y que, por tanto, no ha evitado esta sobrecarga de presión, tienen disminuida la densidad de la corriente transitoria de salida de potasio sensible a 4-AP, es por ésto que concluimos que una dosis no hipotensora de captopril no es capaz de prevenir el desarrollo de la hipertrofia cardíaca.

**Tabla 25:** Capacitancias, densidades de  $I_{to}$  y parámetros de activación de dicha corriente, en células aisladas de corazones hipertróficos recibiendo o no una dosis no hipotensora de captopril.

	APEX		PARED LIBRE		SEPTUM	
	HT n=7	15 n=8	HT n=11	15 n=7	HT n=13	15 n=6
$C_m$ (pF)	215.38 ± 36.8	297.32 ± 48.7	262.99 ± 29.7	310.98 ± 48.2	258.00 ± 19.0	267.79 ± 17.4
$I_{to}$ (pA/pF) [+60 mV]	12.03 ± 0.71	11.36 ± 2.05	8.89 ± 1.09	11.52 ± 2.9	5.26 ± 0.91	5.61 ± 1.16
$G_{max}$ ( $\mu$ S)	18.52 ± 3.9	20.50 ± 8.5	15.45 ± 7.5	26.3 ± 11.6	9.55 ± 4.9	10.60 ± 4.1
$G_{max}/C_m$ ( $\mu$ S/pF)	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02
$V_{50}$ (mV)	3.2 ± 1.2	6.0 ± 1.7	4.1 ± 1.7	5.2 ± 3.2	4.4 ± 2.2	0.1 ± 2.6
K	11.1 ± 0.5	9.8 ± 0.5	10.7 ± 0.6	12.7 ± 1.2	9.9 ± 1.0	8.3 ± 1.7

**HT**, células aisladas de corazones hipertróficos que no han recibido ningún tratamiento; **15**, células aisladas de corazones hipertróficos que han recibido un tratamiento crónico desde los 2 días posteriores a la operación en la que les fue colocado un clip en la aorta abdominal, con un dosis de 15 mg/Kg/día de captopril.  $C_m$ , capacitancia de membrana;  $G_{max}$ , conductancia máxima,  $V_{50}$ , voltaje al cual la activación en estado estacionario es el 50 % de la máxima, K, pendiente de la curva de activación. Los datos expresan medias ± SEM.

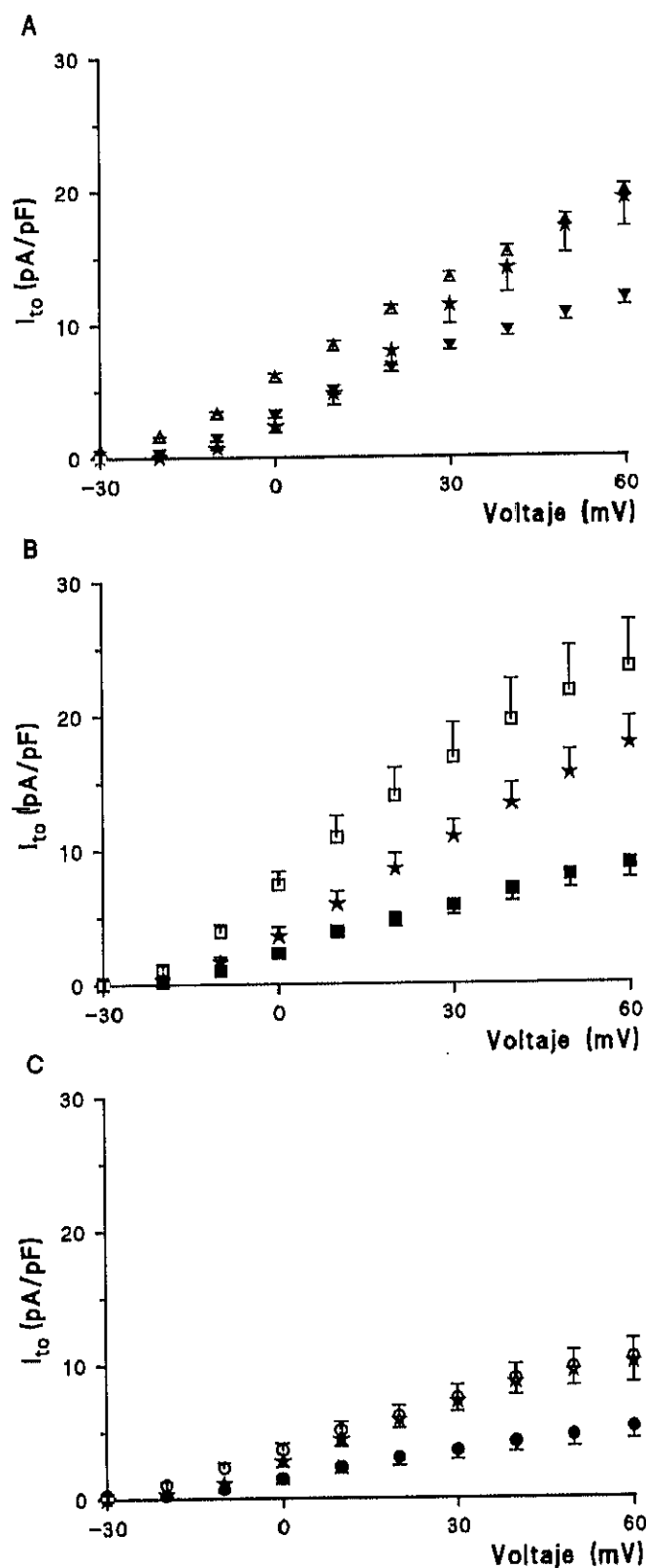
#### 4.7.4.2.- Dosis hipotensora

Los animales con constricción aórtica que habían sido tratados con captopril a una dosis hipotensora, presentaron una presión arterial que no fué estadísticamente distinta de los animales controles sin tratamiento ( $94.5 \pm 14.1$  mm Hg). Además, el tratamiento con esta dosis previno el desarrollo de hipertrofia cardíaca en el 100% de los animales. Estudiamos la  $I_{to}$  en los miocitos aislados de estos corazones y encontramos que las densidades de  $I_{to}$ , a  $+60$  mV, fueron similares a las encontradas en animales controles y mayores, por tanto, de las halladas en las células de los corazones hipertróficos (ver tabla 26 y figura 48). Sin embargo, se observó que la curva de activación en estado estacionario

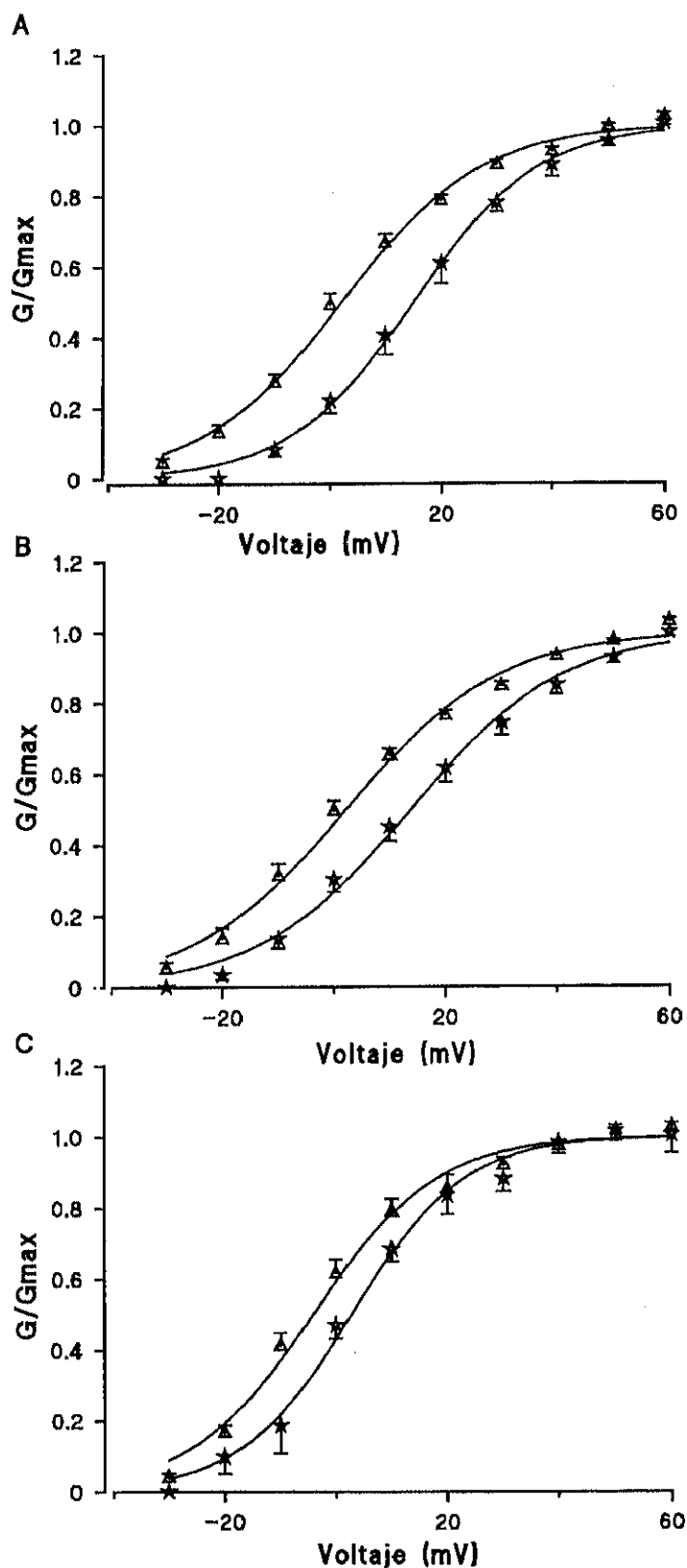
**Tabla 26:** Capacitancias, densidades de  $I_{to}$  y parámetros de activación de dicha corriente en células aisladas de corazones normales recibiendo o no una dosis no hipotensora de captopril.

	APEX		PARED LIBRE		SEPTUM	
	C n=11	400 n=6	C n=15	400 n=9	C n=9	400 n=6
$I_{to}$ (pA/pF) [+60 mV]	19.74 $\pm 0.66$	19.33 $\pm 2.12$	23.38 $\pm 2.50$	17.80 $\pm 2.00$	10.43 $\pm 1.37$	9.93 $\pm 3.15$
$G_{max}$ ( $\mu S$ )	20.15 $\pm 2.4$	14.57 $\pm 2.2$	24.9 $\pm 2.9$	18.19 $\pm 3.3$	12.2 $\pm 1.6$	10.5 $\pm 3.3$
$G_{max}/C_m$ ( $\mu S/pF$ )	0.12 $\pm 0.02$	0.13 $\pm 0.02$	0.17 $\pm 0.09$	0.12 $\pm 0.02$	0.07 $\pm 0.01$	0.09 $\pm 0.02$
$V_{50}$ (mV)	4.00 $\pm 1.8$	15.09 $\pm 2.4$	3.20 $\pm 2.5$	13.13 $\pm 2.3$	-5.20 $\pm 3.2$	-2.8 $\pm 5.6$
K	13.0 $\pm 0.9$	10.6 $\pm 0.2$	16.3 $\pm 2.2$	13.1 $\pm 0.5$	13.0 $\pm 2.2$	10.2 $\pm 2.1$

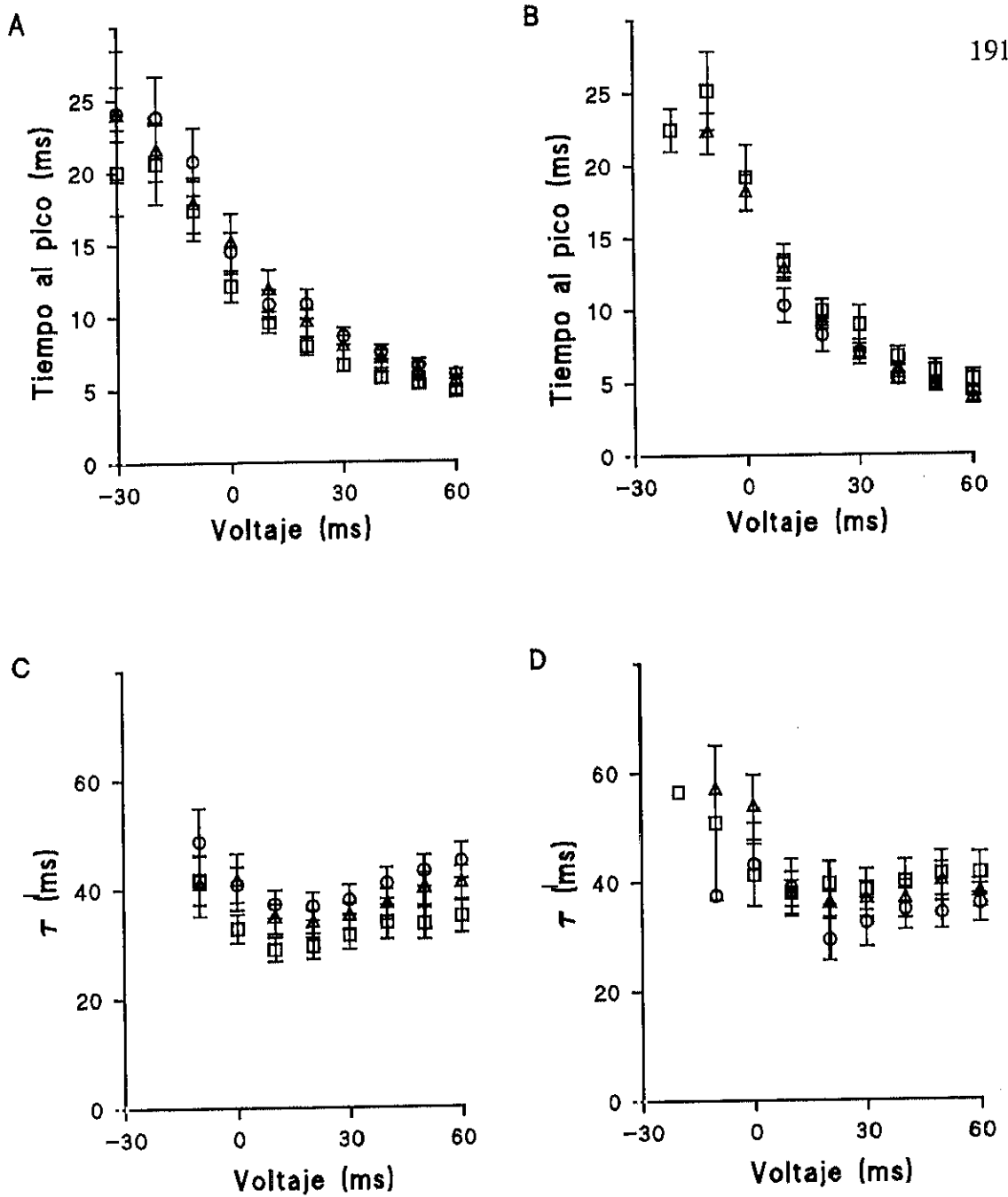
C, células aisladas de corazones controles que no han recibido ningún tratamiento; 400, células aisladas de corazones que han recibido un tratamiento crónico desde los 2 días posteriores a la operación en la que les fue colocado un clip en la aorta abdominal, con un dosis de 400 mg/Kg/día de captopril.  $G_{max}$ , conductancia máxima,  $V_{50}$ , voltaje al cual la activación en estado estacionario es el 50 % de la máxima, K, pendiente de la curva de activación. Los datos expresan medias  $\pm$  ESM.



**Fig. 48:** Representación de las densidades medias de  $I_{to}$  obtenidos a distintos potenciales de membrana, en células aisladas de ápex (A), pared libre (B), y septum (C), de corazones de ratas controles (triángulos blancos) y de animales que recibieron una dosis de 400 mg/Kg/día de captopril desde el segundo día posterior a la constricción de la aorta abdominal (estrellas). Las líneas indican ESM.



**Fig. 49:** Curvas de activación en estado estacionario respecto al voltaje, en células de ápex (A), pared libre (B), y septum (C); de corazones de ratas controles (triángulos blancos) y de animales que recibieron una dosis de 400 mg/Kg/día de captopril desde el segundo día posterior a la constricción de la aorta abdominal (estrellas). Las líneas indican ESM.



**Fig. 50:** A, Tiempos al pico de corriente  $I_{to}$  a cada potencial en células aisladas de corazones controles. B, tiempos al pico de corriente en función del potencial en miocitos aislados de corazones de rata tratada con 400 mg/Kg/día de captopril desde el día segundo después de la estenosis aórtica. En la parte inferior, constantes temporales de inactivación de la  $I_{to}$  ( $\tau$ ), en función del potencial, en miocitos controles (C) y procedentes de corazones de animales con estenosis aórtica y tratados con 400 mg/Kg/día de captopril (D). Los triángulos, cuadrados y círculos indican los valores medios obtenidos en células de ápex, pared libre y septum respectivamente, las líneas verticales expresan  $\pm$  ESM.

se encontraba desplazada hacia potenciales más positivos, como se puede observar en la figura 49 y al comparar los valores del potencial de semiactivación en la tabla 26. Del mismo modo, cuando analizamos el tiempo al pico de corriente, respecto al voltaje, observamos que estaba desplazado hacia potenciales más despolarizados (figura 50 A y B). Sin embargo, la constante de tiempo de la inactivación no estaba modificada (fig 50 C y D).

#### 4.7.5.- SÍNTESIS

El tratamiento crónico con una dosis no hipotensora de captopril no es capaz de inhibir el desarrollo de una hipertrofia cardíaca en la mayoría de los animales. Aunque en un 30% de los animales se podría decir que la hipertrofia es de menor grado, las células comparten las características de las hipertróficas por lo que no se puede hablar de una prevención de la misma.

El tratamiento crónico con una dosis hipotensora previene el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, siendo la densidad de  $I_{to}$  a + 60 mV en las células aisladas de estos corazones similar a la registrada en células aisladas de corazones controles. A pesar de ello, existe una alteración en la cinética de activación de esta corriente, estando desplazada la curva de activación hacia potenciales más despolarizados.

## **5.- DISCUSIÓN**

---

---

La presente Tesis Doctoral podría dividirse en dos grandes partes: una fisiológica y otra farmacológica. En la primera de ellas, hemos querido estudiar la heterogeneidad presente en las características electrofisiológicas del ventrículo izquierdo, puesto que es muy importante el conocimiento de la especialización que existe en un corazón normal para el diagnóstico diferencial de las arritmias cardíacas y su posterior tratamiento, el cual hasta el momento continúa siendo un experimento de ensayo-error (Antzelevitch y cols., 1991). Además, hemos estudiado si esta heterogeneidad puede estar modificada en un corazón hipertrófico, con respecto a uno normal, así como las alteraciones electrofisiológicas presentadas por los corazones hipertróficos. Como características electrofisiológicas hemos estudiado los potenciales de acción y las principales corrientes implicadas en la repolarización del potencial de acción cardíaco, y por tanto responsables de su duración:  $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$  e  $I_{K1}$ .

Los inhibidores del enzima de conversión de angiotensina son un grupo de fármacos ampliamente empleados en clínica como antihipertensivos, que han probado eficacia en la prevención y reversión de la hipertrofia cardíaca (Pfeffer y cols., 1982; Clozel y Hefti, 1989; Eichstaedt y cols., 1989; Linz y cols., 1989a; Thollon y cols., 1989; Rhaleb y cols., 1994), además de ser eficaces en la insuficiencia cardíaca congestiva, donde son capaces de disminuir significativamente la mortalidad (The consensus trial study group, 1987). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio electrofisiológico en las células de los corazones en los cuales se ha inhibido el desarrollo de la hipertrofia por el tratamiento crónico con un inhibidor del enzima de conversión, por lo que en esta Tesis también nos propusimos estudiar, tras el tratamiento crónico con captopril, la corriente iónica que en la primera parte de nuestro estudio se demostró estaba alterada durante la hipertrofia, la  $I_{to}$ . Puesto que se ha querido disociar el efecto inhibidor de la producción de angiotensina II, del efecto hemodinámico en la prevención de la hipertrofia cardíaca (Linz y cols., 1989a), hemos querido probar si una dosis de captopril suficiente para inhibir de forma significativa el enzima de conversión, pero sin efecto hipotensor era capaz de prevenir el desarrollo de hipertrofia cardíaca, y analizar las características de la  $I_{to}$  en los miocitos cardíacos aislados de animales con estenosis aórtica tratados crónicamente con esta dosis baja de captopril. También hemos estudiado el posible efecto directo del captopril sobre



las corrientes iónicas de membrana implicadas en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco en la rata.

A continuación pasaremos a discutir con detalle los resultados obtenidos en cada una de estas secciones.

### **5.1.- HETEROGENEIDAD EN LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN EN EL VENTRÍCULO IZQUIERDO, Y SU MODULACIÓN POR LA HIPERTROFIA**

Los resultados en este estudio se refieren a dos aspectos distintos: 1) la heterogeneidad de las duraciones de los potenciales de acción, que en situación normal presenta el corazón de rata, y 2) la modulación de las características de los potenciales de acción en cada región anatómica en corazones hipertróficos. Respecto al primer punto, los resultados demuestran que los potenciales de acción son significativamente más cortos en las células apicales, seguidos por los de pared libre y septum. Respecto al segundo punto observamos que las células aisladas del ápex y la pared libre de corazones hipertróficos, tienen incrementada significativamente la duración del potencial de acción, con respecto a las células de la misma localización en corazones controles. Por el contrario, el potencial de acción de las células del septum no resulta alterado en el proceso de hipertrofia.

Es un hecho conocido que las propiedades electrofisiológicas de los miocitos cardíacos no están distribuidas homogéneamente en el ventrículo de los mamíferos. La duración del potencial de acción registrado en algunas especies como el gato (Kimura y cols., 1990) y el perro (Antzelevitch y cols., 1991) es mayor en las células del endocardio que del epicardio. En las células de rata, Watanabe y cols. (1983) también encontraron diferentes tipos de potencial de acción según su duración. Estos investigadores encontraron las duraciones más cortas, dentro del ventrículo izquierdo, en las células del ápex, y las más largas en las de la base del ventrículo.

Nuestros resultados demuestran que la duración del potencial de acción es claramente distinta en las tres regiones anatómicas del ventrículo izquierdo que hemos estudiado, el ápex, la pared libre izquierda y el septum. Las células apicales mostraron las

duraciones más cortas y la menor variabilidad, sugiriendo que es un grupo homogéneo. Watanabe y cols. (1983) con el fin de estudiar las características de los potenciales de acción en células cardíacas aisladas, para compararlas con los obtenidos en preparaciones multicelulares, encontraron que existe una heterogeneidad en la duración del potencial de acción en el ventrículo de la rata. Estos autores no utilizaron las mismas localizaciones en su estudio que nosotros, pero sí coincidimos al seleccionar la zona apical, donde también estos investigadores registraron los potenciales de acción con repolarizaciones más rápidas (excluyendo el ventrículo derecho) a los que llamaron tipo II. Sin embargo, Watanabe y cols., (1983) no encontraron potenciales de acción tan largos como los que se han descrito en el septum en la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, Isenberg y Klöckner (1980) también registraron potenciales de acción del ventrículo de rata, observando una heterogeneidad en la repolarización, describiendo dos tipos distintos de potenciales de acción según, su forma y duración a los cuales llamaron tipo b y c. El potencial de acción llamado por ellos tipo b tuvo características similares al tipo III de Watanabe y cols. (1983) y podría encontrarse entre los potenciales de acción obtenidos en nuestro estudio en la pared libre izquierda. Los potenciales de acción llamados por Isenberg y Klöckner tipo c, coinciden con algunos de los potenciales de acción registrados en esta Tesis en el septum interventricular. Las diferencias observadas por distintos investigadores en las duraciones de los potenciales de acción podrían ser debidas a diferencias regionales en las células utilizadas en los diferentes estudios.

Por otro lado, es un hecho sistemáticamente observado que las células de corazones hipertróficos tienen prolongada la duración del potencial de acción (Hayashi y Shibata, 1974; Gülch y cols., 1979; Gülch, 1980; Aronson, 1980), lo cual también se ha observado en nuestros resultados. Sin embargo, en la hipertrofia cardíaca no compensada o en presencia de insuficiencia cardíaca, ciertos autores no han encontrado diferencia (Kaufmann y cols., 1971; Basset y Gelband, 1973) o incluso una disminución (Hemwall y cols., 1984). Aronson y Nordin (1984) observaron que la prolongación en la duración del potencial de acción en ratas con hipertensión renal no era igual en las células del endocardio que del epicardio. Nuestros resultados indican que la duración del potencial de acción no resulta modulada en igual medida por la hipertrofia en las células del ápex, pared

libre y septum. Es posible que este sea el motivo por el cual distintos autores han encontrado diferencias en el porcentaje de aumento de las duraciones de los potenciales de acción en células hipertróficas. En este sentido, Gülch y cols. (1979) estudiaron las características de los potenciales de acción en la pared libre ventricular de corazones controles e hipertróficos de rata por estenosis de la arteria renal, y encontraron un gran aumento en la duración al 50 % de repolarización (un 235 %, a una frecuencia de 0.2 Hz). Mientras que Hayashi (1974) en ratas espontáneamente hipertensas sólo encuentra un incremento de un 10 %. Nuestros resultados, utilizando una frecuencia de estimulación de 1 Hz, han mostrado un aumento de la duración al 50 % de repolarización de 260 % en el ápex, y 69 % en la pared libre, mientras que no encontramos aumento en el potencial de acción de septum. Sin embargo, si no hubiéramos tenido en cuenta la procedencia regional y hubiéramos considerado todas las células controles como un único grupo y todas las hipertróficas como otro, sólo habríamos encontrado un aumento del 9 %, bastante similar al obtenido por Hayashi. Esto prueba que es muy importante considerar la distinta localización de las células a estudiar, puesto que considerarlas como un grupo homogéneo sería un error.

El hecho de que la duración del potencial de acción sea diferente en distintas localizaciones, implica que los períodos refractarios también lo son. De este modo, podríamos afirmar que los períodos refractarios de las células de septum son los mayores, mientras que los de ápex son los más cortos. Sin embargo, no se pueden comparar los períodos refractarios de las células aisladas, puesto que en el corazón entero, el estímulo eléctrico llega antes a unas células que a otras, por lo que quizá aunque una célula tenga una duración del potencial de acción más corta que otra, puede ser que no se repolarice antes que otras células con una duración más larga, si ésta última se excitó antes que la segunda. Cuando el estímulo atraviesa el nodo auriculoventricular y llega a los ventrículos, la parte regional que se activa antes es el septum, seguido del ápex y las paredes libres (Fozzard y Arnsdorf, 1986). El mantenimiento de las diferencias normales en las duraciones de los potenciales de acción de distintas regiones anatómicas es muy

importante, puesto que una alteración en la distribución de la refractoriedad de las células de corazones en situación control, puede ser el inductor de arritmias cardíacas (Aronson y Nordin, 1984). En la práctica el tratamiento de las arritmias está basado en una prueba de ensayo-error hasta encontrar el fármaco adecuado que mejora y no agrava la arritmia. El diagnóstico diferencial de las arritmias cardíacas requiere el conocimiento de las características electrofisiológicas de las células del corazón, incluyendo qué clase de heterogeneidad o especialización existe en el corazón normal (Antzelevitch y cols., 1991). Es decir, las diferencias encontradas en situación de normalidad son las óptimas, y cualquier variación que se produzca en estas diferencias, podría ser la causante de la aparición de una arritmia cardíaca. De hecho se sabe que los corazones hipertróficos son más propensos a sufrir arritmias (McLenachan, 1987; Pye y Cobbe, 1992; Bikkina y cols., 1993), lo cual se ha relacionado, entre otros factores, con la mayor duración del potencial de acción en estas células. En este sentido, Aronson y Nordin (1984) encontraron que las células hipertróficas presentaban con mayor frecuencia actividad espontánea (hecho también encontrado por nosotros, datos no mostrados). Puede ser que esta actividad espontánea sea capaz de generar arritmias más fácilmente en los corazones hipertróficos en los cuales se ha alterado la normal distribución regional de los períodos refractarios, debido a una "homogeneización" o acortamiento de las diferencias de las propiedades electrofisiológicas de los miocitos de distintas localizaciones.

La heterogeneidad en la duración del potencial de acción, encontrada en células cardíacas de distinto origen regional, debe estar relacionada con variaciones en la distribución topográfica de las características de las corrientes implicadas en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco en este animal. Del mismo modo, una alteración en estas corrientes determinará el enlentecimiento en la repolarización, encontrado en las células de ápex y pared libre izquierda.

## 5.2.- CORRIENTE LENTA DE ENTRADA DE CALCIO EN MIOCITOS CARDÍACOS CONTROLES E HIPERTRÓFICOS

Los resultados de este estudio, muestran que en las células normales, no se observan diferencias significativas en las características de la corriente de calcio registrada en células de distinta topografía, es decir, de ápex, pared libre izquierda o septum. En cuanto a la amplitud de la corriente, y su densidad, observamos que existía gran variabilidad de célula a célula (fig. 14), en todas las partes estudiadas. Esto podría explicar las variaciones en las duraciones de los potenciales de acción observadas dentro de cada grupo, pero no las variaciones entre grupos. Es poco probable que estas variaciones se deban a diferencias entre epicardio o endocardio, puesto que estudios realizados sobre la  $I_{Ca}$  en el ventrículo de gato, han demostrado que las características de esta corriente no son distintas entre el epicardio y el endocardio (Kimura y cols., 1991).

Las características de la  $I_{Ca}$  registrada por nosotros fueron similares a las obtenidas por otros investigadores (Bassingthwaighe y Reuter, 1972; Reuter, 1973; Gettes y Reuter, 1974; Scamps y cols., 1990), de esta forma, observamos que la corriente se activa a potenciales positivos a -30 mV, alcanzando el máximo alrededor de 10 mV, y con un potencial de reversión cercano a 60 mV. También observamos que la inactivación en estado estacionario no es completa tras las despolarizaciones prolongadas, esto puede ser debido en parte a la superposición entre los potenciales de activación e inactivación (ver fig 15), que produce una corriente de "ventana" estable (Trautwein y cols., 1975; McDonald, 1982; Reuter y Scholz, 1977), resultando en una corriente de entrada a todos los potenciales positivos al umbral de activación.

La corriente de calcio tipo L es la corriente iónica más estudiada en los corazones hipertróficos, puesto que juega un papel fundamental en el acoplamiento excitación-contracción en el músculo cardíaco. Un incremento en su densidad o un enlentecimiento en su inactivación podría ser responsable de la prolongación en la duración del potencial de acción observado en las células hipertróficas. Sin embargo, los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral no demuestran ninguna modificación significativa ni en la

densidad ni en la cinética de esta corriente en las células hipertróficas, al compararlas con las controles. Las primeras investigaciones destinadas a estudiar las alteraciones electrofisiológicas de los miocitos cardíacos hipertróficos, encontraron un incremento en la duración del potencial de acción, sugiriendo que el motivo sería un aumento de la corriente de calcio o una inactivación más lenta de esta corriente (Aronson, 1980; Gülch y cols., 1979).

Hasta el momento actual se han publicado resultados contradictorios respecto a la magnitud de la corriente lenta de entrada de calcio durante la hipertrofia. Ten Eik y cols. (1983), utilizando un modelo de hipertrofia derecha severa en gato (5-7 meses de sobrepresión), observaron una disminución de la  $I_{Ca}$  sin ninguna modificación en la cinética. En este sentido, también en gato, pero con hipertrofia severa ventricular izquierda, se ha observado que aunque el pico de  $I_{Ca}$  no se alteraba por la hipertrofia, la densidad resultaba disminuida (Nuss y cols., 1993). Por lo tanto, es posible que la disminución en la  $I_{Ca}$  ocurra en estados avanzados de la hipertrofia cardíaca (Houser y cols., 1989), marcando el paso de una hipertrofia compensada a descompensada (Nuss y Houser, 1991; Ryder y cols., 1991; Bailey, 1992). Frente a estos resultados, Keung y cols. (1989), encontraron que la densidad de  $I_{Ca}$  estaba aumentada en las células aisladas de corazones hipertróficos. Estos investigadores no estudiaron las células hipertróficas al azar, sino que escogieron las más pequeñas, de tamaño similar a las células controles, por lo que sus resultados no son representativos de lo que ocurre en todo el corazón hipertrófico (Hart, 1994). En este sentido, Scamps y cols. (1990), sugirieron que la neosíntesis de canales de calcio es previa al crecimiento celular, por lo que si elegimos las células más pequeñas de los corazones hipertróficos, es posible que la síntesis de canales de calcio ya se haya iniciado, resultando en un falso aumento en la densidad de  $I_{Ca}$ . Esta hipótesis no estaría en contradicción con los resultados obtenidos por Ryder y cols. (1993), quienes encontraron un aumento en la  $I_{Ca}$ , pero en un modelo de hipertrofia ligera. En este sentido, Mayoux y cols. (1988) y Primot y cols. (1991) utilizando un modelo de hipertrofia por estenosis aórtica en rata y cobayo respectivamente, encontraron que si bien

el número de canales de calcio se encontraba aumentado tan sólo 5 días después de la estenosis aórtica, el aumento estaba relacionado con el incremento en el tamaño celular de los miocitos hipertróficos, de modo que la densidad permanecía constante.

Volviendo a los resultados de Scamps y cols. (1990), hay que indicar que estos investigadores, utilizando un modelo de hipertrofia moderada por estenosis de la aorta abdominal, obtuvieron resultados similares a los presentados en esta Tesis Doctoral, es decir, no encontraron una diferencia significativa en la densidad de  $I_{Ca}$  entre corazones normales e hipertróficos. Resultados similares se han publicado recientemente en ratas espontáneamente hipertensas con hipertrofia cardíaca moderada (Brooksby y cols., 1993a y 1993b).

Respecto a la cinética de la corriente de calcio, nuestros resultados no indican ninguna variación. Algunos investigadores encontraron un enlentecimiento de la constante de tiempo lenta de la inactivación (Kleiman y Houser, 1988; Keung, 1989; Nuss, 1993), lo que podría hacer que el calcio estuviera fluyendo durante más tiempo, y de esta forma, enlentecer la repolarización del potencial de acción. Sin embargo, nuestros resultados no demostraron ninguna diferencia significativa en las constantes de tiempo, al igual que los resultados de Scamps y cols. (1990). Últimamente, se ha descrito que la corriente de calcio no presenta su forma normal hasta haber transcurrido cierto tiempo desde la ruptura del sello, en el método del *whole-cell recording* (Tiaho y cols., 1993), de esta forma, nada más acceder al espacio intracelular con la micropipeta, no se ve ninguna corriente de entrada, sino de salida, luego, según pasa el tiempo, se empieza a observar un pico de entrada, que va aumentando hasta alcanzar su valor estable aproximadamente a los dos minutos. A la vez que el pico de la  $I_{Ca}$  se va haciendo mayor, su inactivación se va haciendo más rápida, alcanzando valores estables alrededor de los cinco minutos después de la ruptura del sello. Si este efecto fuera debido al tiempo necesario para dializar la célula con la solución interna que lleva la micropipeta, es posible que una célula mayor (por ejemplo, hipertrófica) necesitara más tiempo para alcanzar el estado estable en su inactivación que los cinco minutos de una célula normal, pudiendo ser que diera una constante aparentemente más lenta de inactivación si se hace el registro antes de que se

alcance el valor estable de inactivación. Pero esto no deja de ser una hipótesis, y es posible que las diferencias observadas por distintos autores sean debidas al modelo de hipertrofia utilizado o a la especie, ya que los únicos investigadores que han utilizado el modelo de hipertrofia cardíaca inducida por coartación de la aorta abdominal en la rata, utilizado en esta Tesis, han encontrado resultados similares a los nuestros (Scamps y cols., 1990).

La corriente de calcio alcanza un valor estable, y después de cierto tiempo, comienza a disminuir de forma irreversible hasta desaparecer, a este fenómeno se le llama *rundown* (Belles y cols., 1988), por lo tanto, otra consideración que hay que tener en cuenta a la hora de comparar la  $I_{Ca}$  de distintas células es el tiempo al cual se registra la corriente desde el momento de alcanzar la configuración de *whole-cell*, no sólo para alcanzar el valor estable de la  $I_{Ca}$ , sino también para evitar que algunas células estén afectadas por el *rundown* (Hart, 1994). En nuestros estudios esperamos en todas las células 5 minutos tras alcanzar la configuración de *whole-cell*, después registramos la capacitancia de membrana, y registramos la  $I_{Ca}$  medio minuto después, por lo que en todas las células se realizó el registro de la corriente de calcio al mismo tiempo, suficiente para que la  $I_{Ca}$  hubiera alcanzado valores estables de magnitud y cinética, y demasiado pronto para el comienzo del *rundown*.

En resumen, una posible explicación de lo que pasa en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca sería un aumento rápido en el número de canales de calcio (Mayoux y cols., 1988), seguido de un aumento en la superficie de la membrana celular, de modo que la densidad de  $I_{Ca}$  se mantiene constante en una hipertrofia moderada. En una hipertrofia descompensada que desemboca en una insuficiencia cardíaca, la densidad de  $I_{Ca}$  disminuye, bien por un mayor aumento de la superficie de la membrana, o bien por una disminución en los canales de calcio funcionalmente activos, (Nuss y cols., 1991).



### 5.3.- CORRIENTE TRANSITORIA DE SALIDA EN MIOCITOS CARDÍACOS CONTROLES E HIPERTRÓFICOS

Nuestros resultados en la corriente transitoria de salida de potasio,  $I_{to}$ , sensible a 4-AP, demuestran que existe claramente una diferencia en la distribución de  $I_{to}$  en las células ventriculares de rata en situación control, (ápex, pared libre izquierda, y septum) y esta heterogeneidad topográfica tiende a hacerse menor en el caso de células aisladas de corazones hipertróficos por estenosis de la arteria aorta abdominal, presentando las células hipertróficas una menor  $I_{to}$ .

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran diferencias en la densidad de  $I_{to}$ , en el ápex, pared libre izquierda y septum. En media, la densidad de dicha corriente registrada en las células de la región apical es dos veces la del septum, y en la pared libre tres veces la densidad de  $I_{to}$  encontrada en el septum (fig. 20). Debemos indicar que en este estudio hemos encontrado una mayor variabilidad en la  $I_{to}$  de células procedentes de la pared libre, que en los otros dos grupos, debido, aparentemente, a una composición heterogénea de este grupo. En realidad, previamente se ha descrito una gran variabilidad en la corriente transitoria de salida en conejo (Giles e Imaizumi, 1988) y, recientemente, Liu y cols. (1993) han demostrado que la  $I_{to}$  es prominente en el epicardio y muy pequeña en el endocardio del corazón de perro. Por lo tanto, no podemos descartar que la mayor variabilidad encontrada en las células de la pared libre sea debida a diferencias en la  $I_{to}$  entre el epicardio y el endocardio en células cardíacas de rata. También Furukawa y cols. (1990a) encontraron que en el epicardio de corazones de gato la  $I_{to}$  era prominente, en oposición a la capa endocárdica. Para explicar las diferencias en la duración del potencial de acción observadas en el ventrículo izquierdo de conejo, Fedida y Giles (1991) también sugirieron una diferencia en la distribución de la corriente transitoria de salida. En la rata, con los resultados que hasta ahora hemos obtenido, podríamos sugerir que la duración más corta del potencial de acción encontrada por Watanabe y cols. (1983) y por nosotros en el ápex, se relaciona con la gran  $I_{to}$  encontrada en las células de esta localización, y la repolarización más lenta de las células septales está relacionada con la menor corriente transitoria de esta región del corazón (ver figuras 12 y 20).

Las posibles diferencias en el potencial de reposo, podrían alterar la disponibilidad de la  $I_{to}$  e inducir una aparente diferencia regional en sus características. En realidad, no hemos encontrado diferencias regionales en el potencial de reposo al estudiar las características de los potenciales de acción (ver tabla 7). La distribución heterogénea de las densidades de la corriente transitoria encontrada en los ventrículos normales no puede ser relacionada con desplazamientos en las curvas de activación o inactivación en estado estacionario, puesto que no encontramos diferencias de estas curvas, ni en los voltajes de semiactivación o semiinactivación, ni en la pendiente de la curva entre los grupos estudiados. Sólo hemos encontrado una ligera tendencia, no significativa, para las células del septum, a presentar mayores constantes de tiempo de inactivación entre +20 y +60 mV (fig 24). Puesto que no podemos afirmar que la diferencia en la distribución de  $I_{to}$  en el ventrículo sea debida a una cinética diferente, y no hemos hecho análisis en canal único, no podemos excluir que haya diferencias en las características de las corrientes unitarias, aunque podemos considerar: 1) que la probabilidad de apertura del canal está relacionada probablemente con la dependencia del voltaje que se observa en las corrientes macroscópicas, como se ha sugerido por McDonald y cols. (1986) para la corriente del canal de  $Ca^{++}$ , y también probablemente para la corriente transitoria, como ha sido propuesto por Clark y cols. (1988), basándose en el efecto similar entre la frecuencia del estímulo en la amplitud de la corriente en *whole cell* y la probabilidad media de apertura del canal aislado; 2) La relación corriente-voltaje y la conductancia pueden ser similares de una región a otra. Suponiendo que estas hipótesis sean correctas, la conductancia máxima calculada para ápex, pared libre y septum, puede ser considerada como una forma indirecta de estimar el número máximo de canales en estado abierto. Siguiendo con este razonamiento, podríamos sugerir que la densidad de los canales funcionales es menor en las células aisladas del septum, en comparación con las de la pared libre y el ápex. Una conclusión similar a ésta ha sido sugerida por Fedida y Giles (1991) quienes encontraron que la amplitud y cinética del canal único de la corriente transitoria es igual en epicardio y endocardio de conejo, mientras que la densidad de corriente macroscópica era mayor en epicardio que en endocardio o músculo papilar. Más aún, nuestros hallazgos en las células de corazones hipertróficos parecen estar de acuerdo con la asunción de una diferente distribución de las densidades de canales funcionales.

Nuestros resultados en el estudio de los potenciales de acción de células hipertróficas indican un incremento en su duración en comparación con las células normales, pero la hipertrofia no afecta de una forma homogénea a todas las células ventriculares. Los resultados obtenidos en la presente Tesis sobre la  $I_{to}$  muestran una disminución global de la densidad de  $I_{to}$  en el ventrículo hipertrófico de rata por estenosis de la aorta abdominal. Este descenso estuvo relacionado con una disminución en las conductancias máximas normalizadas por las correspondientes capacitancias. La hipertrofia no indujo cambios en las curvas de activación e inactivación en estado estacionario. Una posible explicación podría basarse en que la hipertrofia no induce neosíntesis de los canales de  $I_{to}$ , por lo cual, al crecer la membrana celular, se induce un descenso de la densidad de canales por superficie, pero no en el número absoluto de canales por célula, al menos en el ápex y la pared libre. Este comportamiento podría ser el contrario del proceso adaptativo para los canales de calcio, en el cual, como hemos sugerido en la sección dedicada al estudio de la corriente de calcio en células hipertróficas, el número total de canales por célula estaría incrementado, aunque la densidad permanezca constante. Por el contrario, los canales de  $I_{to}$  en la hipertrofia, podrían ser comparados con otras proteínas de membrana, como receptores  $\beta$ -adrenérgicos y muscarínicos, los cuales resultan disminuidos en densidad en los corazones hipertróficos de rata, pero no su número por célula, lo que sugiere que los genes que codifican para estos receptores no están regulados en la hipertrofia (Mansier y cols., 1990). Más aún, debemos indicar que el descenso en la densidad de  $I_{to}$  observado en las células hipertróficas, fue del mismo orden que el observado en las primeras etapas del desarrollo en células ventriculares de rata (Kilborn y Fedida, 1990).

Nuestros resultados en la  $I_{to}$  en células hipertróficas están de acuerdo con los obtenidos por Kleiman y Houser (1988) y Bouron y cols. (1992), quienes han sugerido, basándose en las anomalías halladas estudiando la corriente de calcio en un medio donde la  $I_{to}$  no estaba bloqueada, que la  $I_{to}$  podría estar disminuida, lo que Xu y Best (1991) han confirmado, mostrando que la corriente transitoria de salida estaba disminuida en corazones hipertróficos de rata acromegálica. Además, en las células humanas de septum hipertrófico por sobrepresión, la corriente de calcio es predominante sobre la transitoria

de salida (Bénitah y cols., 1992a), a la vista de nuestros resultados, esto podría ser explicado por dos motivos, siendo el primero que el septum, que en situación de normalidad tiene una pequeña  $I_{to}$ , y segundo, que resulta aún más disminuida en la hipertrofia. Sin embargo, otros autores han encontrado un aumento en la densidad de  $I_{to}$  en corazones hipertróficos (Keung y cols., 1987; Zhang y cols., 1991a). Estos resultados distintos a los nuestros podrían estar relacionados con la utilización de un modelo diferente de inducción de la hipertrofia cardíaca experimental, o con el hecho de que no tuvieron en cuenta la heterogeneidad según la procedencia regional de las células.

Los resultados obtenidos en esta sección de la presente Tesis, podrían explicar en parte los resultados que hemos obtenido en el análisis de los potenciales de acción. Por un lado, la menor densidad de  $I_{to}$  en las células septales está relacionado con los potenciales de acción más largos registrados en esta región, la gran  $I_{to}$  encontrada en el ápex, en comparación con el septum, puede estar relacionada con los potenciales de acción más cortos registrados en la región apical y en la zona de la pared libre izquierda se ha encontrado la mayor variabilidad tanto en los potenciales de acción como en la  $I_{to}$ . La disminución en la densidad de la  $I_{to}$  en las células hipertróficas y la tendencia a la homogeneización en estas células con respecto a esta corriente podría explicar el incremento en la duración del potencial de acción y su menor heterogeneidad en los miocitos hipertróficos, pero no explica la razón por la cual, a pesar de que en las células del septum interventricular se produce un descenso en la densidad de  $I_{to}$ , no se acompaña de un enlentecimiento de la repolarización. Esto hace pensar que la contribución de esta corriente a la duración del potencial de acción pueda ser más o menos importante, según la localización topográfica considerada.

#### **5.4.- CONTRIBUCIÓN DE LAS CORRIENTES DE CALCIO Y TRANSITORIA A LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN EN CADA CÉLULA**

La fase de repolarización del potencial de acción cardíaco es el resultado del balance entre las corrientes de entrada, que tienden a despolarizar la célula y las de salida, que tienden a repolarizarla. En los análisis de potenciales de acción que hemos expuesto

en la primera parte de esta Tesis, observamos que son distintos en duración en las zonas del ápex, pared libre izquierda y septum, en el corazón normal; y que en los corazones hipertróficos la repolarización se enlentece en las células de las dos primeras regiones que acabamos de mencionar. El incremento de la duración del potencial de acción es más marcado en la fase temprana de la repolarización (ver fig 11), por lo que en este estudio hemos elegido el nivel del 20 % de repolarización, para analizar los tres parámetros: duración del potencial de acción,  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$ . Hasta la fecha, ningún estudio había medido los tres parámetros en la misma célula, aunque otros investigadores, entre ellos Mitchell y cols. (1984), habían demostrado que tanto la  $I_{Ca}$ , como la  $I_{to}$  contribuyen a la duración del potencial de acción cardíaco en la rata.

Como acabamos de recordar, el potencial de membrana resulta siempre del balance entre las corrientes de entrada y de salida que fluyen a través de la membrana. En nuestros resultados, el potencial correspondiente al 20 % de repolarización está alrededor de 10 mV, encontrándose los valores individuales, comprendidos siempre entre los límites de 0 y 20 mV. A estos niveles de potencial, la corriente de calcio es importante y la  $I_{to}$  ya ha comenzado a activarse. Por ello, hemos relacionado la duración del potencial de acción, al 20 % de repolarización, con la suma de estas dos corrientes, registradas en cada célula al potencial correspondiente a este nivel de repolarización. En este sentido, los resultados presentados en esta Tesis, demuestran que en las células donde se registran los potenciales de acción más cortos, esto es en la región apical, la corriente total registrada en ausencia de sodio (ver fig 28), es fundamentalmente de salida, lo que se corresponde con la suma de la  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  al potencial correspondiente al 20 % de repolarización, de signo positivo en este grupo de células (ver fig. 27). Por el contrario, en las células del septum, los potenciales de acción presentan una repolarización lenta, y es precisamente en esta parte donde la corriente total es fundamentalmente de entrada, lo que se corresponde con una corriente suma de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  de signo negativo (ver fig. 28 y 27). Puesto que las mayores diferencias en corrientes entre estos dos grupos de células se encuentran en la  $I_{to}$ , podemos afirmar que la gran corriente transitoria registrada en todas las células del ápex es de mayor magnitud que la corriente de calcio, desviando el equilibrio entre ambas hacia una corriente neta de salida. Por el contrario, la pequeña  $I_{to}$  registrada en las células septales,

es siempre de menor magnitud que la corriente de entrada de calcio, desviando el balance entre ambas hacia una corriente neta de entrada. En las células de la pared libre hemos encontrado mayor variabilidad, tanto en la  $I_{to}$  como en la duración del potencial de acción. En unas células de esta región, la  $I_{to}$  es prominente, provocando que la corriente resultante sea positiva, y los potenciales de acción de corta duración, en otras la  $I_{to}$  es menor y no es suficiente para contrarrestar el efecto de la  $I_{Ca}$ , presentando estas células una repolarización más lenta; pero en cualquier caso, la corriente transitoria de salida de la pared libre izquierda, siempre es mayor que en septum, lo que está de acuerdo con la mayor duración de los potenciales de acción registrados en esta última región.

El estudio completo en una misma célula del potencial de acción y las corrientes  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  (medidas al 20 % de repolarización), nos han permitido demostrar que en el corazón normal existe una relación del mismo orden entre la corriente neta ( $I_{Ca} + I_{to}$ ) y la duración del potencial de acción en las células del ápex y de la pared libre, pero las células del septum interventricular se comportan de forma distinta, no encontrándose la misma contribución de la corriente neta resultante que en las otras regiones (ver fig. 27). Basándonos en estos resultados, podemos afirmar que el incremento en la duración del potencial de acción encontrado en las células hipertróficas de ápex y pared libre, se debe a una disminución en la densidad de  $I_{to}$ . Sin embargo, en las células del septum interventricular, no hemos encontrado una relación entre la duración del potencial de acción, y ambas corrientes por separado, ni sumándolas (corriente neta). Este hecho puede indicar, que en esta región existe alguna otra corriente que participe en la repolarización, aunque no podemos olvidar que en los miocitos aislados del septum interventricular, la  $I_{to}$  es muy pequeña, por lo que es lógico pensar que pueda ser menos importante en la determinación de la duración del potencial de acción. Esta falta de correlación entre la  $I_{to}$  y la  $I_{Ca}$  y la duración del potencial de acción, podría explicar, al menos en parte, por qué aunque en las células hipertróficas de esta región también se observa una disminución en la  $I_{to}$ , no se traduce en un incremento en la duración del potencial de acción.

En las células hipertróficas se altera la contribución normal de las corrientes  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  a la fase de repolarización, a la vez que se pierde la heterogeneidad existente en los

corazones controles (ver figura 27). Esta alteración con la hipertrofia cardíaca es muy importante, puesto que si administramos un fármaco que actúe en alguna de estas dos corrientes, sabemos lo que ocurrirá en la forma del potencial de acción en un corazón normal, pero puede tener menos efecto en un corazón hipertrófico. La pérdida de la relación entre las densidades de  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$  y la duración del potencial de acción en las células hipertróficas puede ser debida a una disminución general en la  $I_{to}$ , lo que la hace menos importante. De todas formas, la duración y forma del potencial de acción siempre está determinada por las corrientes iónicas que fluyen durante él en el miocito cardíaco, por lo que podemos intuir que en las células hipertróficas, se haga más importante en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco alguna otra corriente distinta de la  $I_{Ca}$  y la  $I_{to}$ .

### 5.5- CORRIENTE DE FONDO EN MIOCITOS CARDÍACOS NORMALES E HIPERTRÓFICOS

A la vista de los resultados anteriores, en los cuales no acaba de demostrarse la razón por la cual la disminución en la  $I_{to}$  en las células del septum hipertrófico, en comparación con el normal, no se traduce en una prolongación de la duración del potencial de acción, decidimos estudiar las corrientes de fondo de los miocitos cardíacos de corazones de rata normales e hipertróficos. Además, quisimos determinar si tanto la heterogeneidad regional de las propiedades electrofisiológicas del corazón normal, como las alteraciones presentadas en el corazón hipertrófico, pueden estar determinadas en parte por una diferencia en las propiedades eléctricas de las corrientes de fondo. Puesto que hemos encontrado diferencias en las propiedades electrofisiológicas de las células del ventrículo izquierdo de rata en las regiones de ápex, pared libre y septum, decidimos estudiar las corrientes de fondo en las células cardíacas de estas tres regiones, tanto en corazones normales como hipertróficos. Además, en el caso de la  $I_{K1}$ , se ha demostrado que las densidades de corriente en ventrículo izquierdo de gato, son mayores en las células de endocardio que en epicardio, tanto en el sentido de salida como en el de entrada (Furukawa y cols., 1992). Más aún, puesto que la duración del potencial de acción en las células hipertróficas resulta aumentado, es posible que las corrientes de fondo estén

implicadas, puesto que la principal corriente de fondo en la rata, la  $I_{K1}$ , también contribuye a la duración del potencial de acción (Pennefather y Cohen, 1990; Surawicz, 1992; Martin y Chin, 1992).

Los principales resultados en este estudio fueron dos: 1) la distribución de la corriente de rectificación de entrada en el ventrículo izquierdo de la rata es homogénea y no resulta modificada en la hipertrofia debida a sobrecarga de presión; 2) el proceso de hipertrofia parece activar la aparición de otra corriente de fondo distinta de la  $I_{K1}$ .

#### 5.5.1.- CORRIENTE DE FONDO TOTAL Y SENSIBLE A BARIO ( $I_{K1}$ )

La corriente de fondo total observada en nuestros experimentos es similar a la obtenida por Kleiman y Houser (1989) en miocitos ventriculares de gato (Kleiman y Houser, 1989). Estos investigadores, asumiendo que la única corriente que puede contaminar la  $I_{K1}$  a potenciales positivos a -20 mV es la  $I_K$  en los miocitos cardíacos normales e hipertróficos, limitaron su estudio al análisis de la corriente total de fondo, obtenida de un protocolo de rampa entre -90 y -20 mV. En estas condiciones, el potencial de reversión de esta corriente fue similar en las células controles e hipertróficas, y la densidad de corriente de entrada fue significativamente mayor en los miocitos hipertróficos que en los normales, (ver figura 11 en esta referencia), lo cual es comparable con nuestros datos (ver figura 30 y tabla 19). Sin embargo, la densidad de la corriente de salida fue mayor y la región de pendiente negativa más prominente en las células hipertróficas. En este sentido, nosotros no hallamos ninguna diferencia significativa a estos potenciales, y no observamos una zona de pendiente negativa en las células hipertróficas. Aunque esta di discrepancia puede ser debida a la diferencia entre especies, nos preguntamos si alguna corriente contaminante podía ser inducida o alterada significativamente en el proceso de hipertrofia, explicando las diferencias en la curva corriente-voltaje encontradas entre los miocitos normales e hipertróficos. Para analizar esta posibilidad utilizamos bario extracelular, un conocido bloqueante de la  $I_{K1}$  (Sakman y Trube, 1984; Shah y cols., 1987; Tourneur y cols., 1987), para caracterizar la  $I_{K1}$  como la corriente sensible a este ión (Pennefather y Cohen, 1990).



El primer paso fue determinar si existen diferencias regionales entre ápex, pared libre y septum, en la corriente sensible a bario,  $I_{K1}$ . La figura 32 muestra claramente que las curvas densidad de corriente-voltaje son muy similares en estas tres regiones, tanto en los miocitos aislados de corazones controles como de hipertróficos. Aunque no utilizaron las mismas localizaciones, Liu y cols (1993) encontraron que la corriente  $I_{K1}$ , definida como la corriente de estado estacionario sensible a 10 mM de  $\text{Cs}^+$ , o la diferencia entre la corriente medida en presencia y ausencia de potasio extracelular, era comparable en las células aisladas de epicardio, endocardio y midmiocardio de perro. Por el contrario, Furukawa y cols. (1992) encontraron que la  $I_{K1}$  era prominente en las células del endocardio y no en el epicardio de la pared libre de corazones de gato, sugiriendo que era el diferente número de canales funcionales, el responsable de las diferencias que encontraron en la  $I_{K1}$ . Esto sugiere que la variabilidad entre especies sea la responsable de la diferente distribución regional de esta corriente (Liu y cols., 1993).

El presente estudio demuestra que la  $I_{K1}$ , definida como la corriente sensible a bario no resulta alterada en los miocitos aislados de corazones de rata a los que se les ha inducido una hipertrofia por sobrepresión. Además, en todos los grupos las variaciones de la densidad de corriente y la conductancia de entrada, expresadas en las desviaciones estándar, fueron similares (ver tabla 20 y fig. 32), lo que sugiere que estamos trabajando con una población similar de células. Estos hallazgos están en aparente contradicción con los encontrados por Kleiman y Houser (1989), quienes observaron un incremento en la densidad de  $I_{K1}$  en los corazones hipertróficos. En realidad, estos autores registraron la  $I_{K1}$  como la corriente de fondo total obtenida entre -90 y -20 mV, basándose en la asunción de que tanto en las células controles como en las hipertróficas, la mayoría de la corriente de fondo se debe a la  $I_{K1}$ . Estas observaciones, junto con nuestros hallazgos, nos llevan a la hipótesis de que alguna otra conductancia, alterada o inducida por el desarrollo de la hipertrofia, pueda contaminar la corriente de fondo (fig. 33). Por otra parte, hay que indicar que las capacitancias de membrana (tabla 19), expresión de la superficie celular, fueron mayores en las células hipertróficas, lo cual estuvo en relación con las mayores amplitudes de  $I_{K1}$  registradas en las células hipertróficas. Una posible explicación es que en el proceso adaptativo de la hipertrofia se induce la síntesis de canales de  $I_{K1}$  a la vez

que la membrana crece, de forma que la densidad de canales de  $I_{K1}$  no varíe en las células hipertróficas, una explicación similar se ha sugerido para los canales de calcio (Scamps y cols., 1990).

### 5.5.2.- CORRIENTE INSENSIBLE A BARIO

Puesto que la corriente remanente tras la perfusión con 2 mM de  $\text{BaCl}_2$  en las células hipertróficas fue sistemáticamente mayor que en las controles (fig. 33), se consideró improbable que estas diferencias fueran provocadas por una corriente de "goteo". Nuestros hallazgos sugieren la presencia de una corriente de salida adicional en los miocitos hipertróficos. El bloqueante de cloro, 9-AC, inhibió parcialmente esta corriente de fondo insensible a bario, sin modificar el potencial de reversión. La ausencia modificación en el potencial de reversión sugiere que la variación en la conductancia fue debido a una corriente sensible a 9-AC. Por este motivo, proponemos que al menos en parte, el ión transportador de carga de esta corriente resistente a bario, es el cloro. El bloqueo parcial del 9-AC ya ha sido observado en otras corrientes de cloro, tanto en la activada por isoproterenol, como en la inducida por "estiramiento" de la membrana y puede deberse a una acción muy lenta del bloqueante a nivel intracelular (Sorota, 1992; Harvey y cols., 1990). Algunas corrientes de potasio, incluyendo la sensible a TEA encontrada por Apkon y Nerbonne (1991) fueron farmacológicamente descartadas. Sin embargo, la posibilidad de que se trate de una corriente catiónica no selectiva, junto con una conductancia de cloro, no puede desecharse. Además, un mecanismo posible que podría contribuir al componente de salida, es el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , puesto que la concentración externa de calcio era de 1.8 mM y la intracelular de sodio 10 mM, con sólo 5 mM e EGTA en el interior de la pipeta.

Sorprendentemente, no encontramos diferencias en el potencial de reposo entre las células normales y las hipertróficas a pesar del incremento en la corriente resistente a bario, la cual presentó un potencial de reversión de -30 mV en las células hipertróficas. Esta observación fue consistente con otras series de experimentos de la presente Tesis. En el estudio de los potenciales de acción, el potencial de reposo de las células controles (#

poner valor  $n=50$ ) no fue distinto del encontrado en las células hipertróficas ( $n=66$ ) en las mismas condiciones. El hecho de que el potencial de reposo no esté modificado, está de acuerdo con el hallazgo de que el potencial de reversión de la corriente de fondo total no está modificado en la hipertrofia (ver tabla 19). La discrepancia se basa en el hecho de que para una  $I_{K1}$  muy similar en las células controles e hipertróficas, la corriente resistente a bario, significativamente mayor en las células hipertróficas, no induce una despolarización de estas células. Hasta el momento, no podemos dar explicación a estas discrepancias, sin embargo, aunque esta corriente sea significativamente mayor en las células hipertróficas, representa sólo una fracción muy pequeña de las corrientes de fondo (ver tablas 19, 20 y 21). En realidad, la conductancia de entrada de esta corriente resistente a bario, que podría reflejar la influencia despolarizadora de esta corriente, es 5 ó 6 veces menor que la conductancia de la  $I_{K1}$ . Esta magnitud relativamente pequeña, junto con su gran variabilidad (ver tabla 21), podría contribuir a reducir o enmascarar su influencia en el potencial de reposo y de reversión de la corriente de fondo total registrada en los miocitos hipertróficos.

Es probable que una corriente de cloro sensible a 9-AC sea un componente de esta corriente resistente a bario, pero no el único, puesto que el potencial de reversión fue alrededor de 25 mV más negativo del predicho por el potencial de equilibrio del cloro en nuestras condiciones experimentales. En cualquier caso no se puede relacionar con ninguna corriente catiónica conocida y su modulación no ha sido determinada, puesto que ni la estimulación  $\alpha$ - ni la  $\beta$ -adrenérgica produjeron efecto en esta corriente, en contraste con: a) la corriente de cloro dependiente del AMP cíclico, que resulta activada por isoproterenol y forskolina (Bainski y cols., 1989; Harvey y Hume, 1989; Harvey y col., 1990a); b) la corriente inducida por "estiramiento" de la membrana, que resulta modulada por el isoproterenol (Sorota, 1992); o c) la corriente de salida de potasio independiente de calcio activada por el voltaje, que resulta reducida por la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica (Apkon y Nerbonne, 1988; Fedida y cols., 1989).

Si se considera el efecto del 9-AC en la duración del potencial de acción (ver fig 35), se puede sugerir que un efecto del componente de cloro en la corriente de fondo total

sería acortar la duración del potencial de acción en las células hipertróficas. Debemos indicar que el porcentaje de aumento de la duración del potencial de acción inducido por 9-AC, es más prominente en la meseta que la fase 3 (ver la correspondiente sección de resultados y la fig. 35), lo que está de acuerdo con el hallazgo de que el 9-AC indujo una disminución de la corriente de fondo resistente a bario a potenciales positivos a su potencial de reversión (aproximadamente -30 mV). Además, posiblemente el efecto del 9-AC incrementa el desequilibrio inducido, por una parte por el descenso en la densidad de canales funcionales de la corriente transitoria de salida en las células hipertróficas, y por otra parte, por el mantenimiento en la densidad de corriente de entrada de calcio tipo L (Scamps y cols., 1990; ver resultados en la sección 4.2 de esta Tesis), lo que explicaría que el efecto del 9-AC sea más marcado al principio de la repolarización. El acortamiento de la duración del potencial de acción, y de esta forma del período refractario podría representar un mecanismo compensatorio en el corazón hipertrófico que contrarreste en parte, la prolongación de la duración del potencial de acción que ocurre en corazones hipertróficos a consecuencia del descenso de la  $I_{to}$  (ver resultados en la sección 4.3 de esta Tesis), lo cual se ha sugerido que puede predisponer al corazón a postpotenciales y actividad desencadenada (Aronson, 1981). Además, en la sección donde estudiamos los potenciales de acción de diferentes partes anatómicas de los corazones de rata controles e hipertróficos (ver sección correspondiente), observamos que en el septum interventricular la duración del potencial de acción no se modificaba en la hipertrofia con respecto a las células septales controles. Sin embargo, la corriente  $I_{to}$  se hallaba disminuida también en esta parte en las células hipertróficas (ver tabla 13). Esto se podría explicar porque en el septum la corriente transitoria es pequeña, y el efecto de prolongar la repolarización esperado por su disminución en la hipertrofia, estaría compensado por la presencia de la corriente sensible al 9-AC, que tendería a acortar la duración del potencial de acción. En las otras partes estudiadas, pared libre del ventrículo izquierdo y ápex, la corriente transitoria de salida es mucho más importante que en el septum, y la pequeña magnitud, en comparación con la  $I_{to}$ , de la corriente resistente a bario, aunque quizá limite el alargamiento del potencial de acción, no es suficiente para evitar el efecto prolongador del potencial de acción inducido por la disminución en la densidad de  $I_{to}$ .

## 5.6.- EFECTO DEL CAPTOPRIL

Hasta la fecha, varios estudios han demostrado una inhibición del desarrollo de la hipertrofia cardíaca mediante el tratamiento crónico con captopril (Pfeffer y cols., 1982; Rossi y Peres, 1992) o con otros IECA (Clozel y Hefti, 1988; Linz y cols., 1989a), sin embargo, no se ha investigado si las características electrofisiológicas de esos corazones en los cuales se ha conseguido revertir la hipertrofia, corresponden a las de un corazón normal, o por el contrario continúan alteradas. Por otra parte, en la inducción de la hipertrofia cardíaca, se ha querido disociar el efecto hemodinámico del efecto de la AT II a nivel cardíaco, e incluso se ha demostrado que dosis no hipotensoras de un IECA, el ramipril, es capaz de revertir la hipertrofia cardíaca (Linz y cols., 1989a). Nuestro objetivo fue, por una parte, estudiar electrofisiológicamente los corazones de animales en los cuales se ha prevenido el desarrollo de la hipertrofia cardíaca mediante el tratamiento con una dosis hipotensora de captopril, determinando si la densidad de la  $I_{to}$ , parámetro alterado en los corazones hipertróficos, es normal o no. Por otro lado, quisimos comprobar si una dosis no hipotensora de captopril, pero capaz de inhibir el ECA, era o no capaz de prevenir la hipertrofia cardíaca, y analizar la  $I_{to}$  en estos corazones.

Puesto que nos proponíamos estudiar la prevención o no de las alteraciones en una corriente iónica después de un tratamiento crónico, nos pareció conveniente conocer primero si el captopril ejercía algún efecto directo sobre las corrientes iónicas. En este sentido, nuestros resultados no mostraron ningún efecto de este fármaco en las corrientes  $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$ , e  $I_{K1}$ . Estos hallazgos contrastan con los obtenidos por Bryant y cols. (1991), quienes, utilizando miocitos de cobayo, encontraron una pequeña disminución en la  $I_{Ca}$ , con la misma dosis de captopril que utilizamos nosotros; sin embargo no pudieron revertir este efecto tras el lavado del fármaco en la mayoría de las células, lo cual pueda ser un indicio de la presencia de *rundown* en sus experimentos, aunque una diferencia debida a la distinta especie utilizada no puede descartarse. Frente a los resultados de Bryant y cols. (1991), los estudios de Räcké y cols. (1994), también en miocitos ventriculares de cobayo, sugieren un incremento en la  $I_{Ca}$  con fosinoprilato. Este efecto, unido a la disminución en la  $I_K$ , sería el responsable de la prolongación en la duración del potencial de acción

observado por estos investigadores. Puesto que se ha sugerido que los IECA con o sin grupo sulfhidrilo podrían tener distintos mecanismos de acción (Przylenk y Kloner, 1991), Ribuot y cols. (1994) han estudiado el efecto directo de varios IECA sobre la duración del potencial de acción en ventrículo de rata. Los fármacos utilizados fueron: el captopril (con grupo sulfhidrilo), SQ 14,534 (un estereoisómero del mismo, pero sin actividad IECA) y el perindoprilato (IECA sin grupo SH). Sus resultados mostraron una prolongación de la duración del potencial de acción al 90% de repolarización con captopril ( $10^{-5}\text{M}$ ) y perindoprilato, pero no con el SQ 14,534, lo que indica que el efecto observado con el captopril no depende del grupo sulfhidrilo, sino de su propiedad IECA. Estos investigadores observaron el mismo efecto con AT I y BK, por lo que sugirieron que quizá el efecto observado en el potencial de acción con los IECA no se debiera a una acción directa de este grupo de fármacos, sino a una acumulación local de BK y AT I. Además de los resultados expuestos en esta Tesis sobre el efecto directo del captopril, otros investigadores también han fallado en encontrar un efecto directo de este fármaco en las características electrofisiológicas de los miocitos cardíacos: Hemsworth y cols. (1989) no encontraron ninguna modificación en los potenciales de acción de ventriculares de cobayo, en presencia de captopril ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , y  $10^{-4}\text{M}$ ), por lo que sugirieron que los efectos antiarrítmicos de este fármaco no se deben a un efecto directo en las corrientes iónicas de membrana. Más recientemente, estudios realizados con perindoprilato no encontraron ningún efecto directo en la  $I_{Ca}$  (Enous y cols., 1992). Tampoco Linz y cols. (1989b) encontraron ninguna modificación significativa en la duración del potencial de acción cardíaco en el músculo papilar de cobayo o el nodo sinusal de conejo con ramiprilato, lo que les llevó a afirmar que este fármaco no tenía acciones electrofisiológicas directas. De nuestros resultados podemos concluir que el captopril no produce ningún efecto en la amplitud de las corrientes  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$ , o  $I_{K1}$ , en muestras condiciones experimentales, y por lo tanto, el efecto antiarrítmico que otros investigadores han encontrado no sería debido a una acción directa, sino a un efecto cardioprotector mediado por otros mecanismos (Pahor y cols., 1994).

En los estudios de prevención de la hipertrofia, nuestros resultados utilizando una dosis no hipotensora de captopril, pero capaz de inhibir significativamente el ECA, han

mostrado que no es capaz de prevenirla. Esta falta de efecto no sólo se manifiesta a nivel macroscópico, es decir, la masa del corazón, sino que la corriente transitoria de salida de potasio sensible a 4-AP, resulta igualmente disminuida en densidad en las células procedentes de corazones hipertróficos, hayan estado o no tratados crónicamente con una dosis no hipotensora de captopril. En algunos animales el grado de hipertrofia fue menor, pero la corriente  $I_{to}$  permanecía igualmente disminuida, por lo que no podemos hablar de prevención de la hipertrofia en ningún caso. Otros estudios utilizando ramipril, mostraron una prevención de la hipertrofia inducida por constricción de la aorta con dosis hipotensoras de este fármaco (Linz y cols., 1989a) y una reversión tanto con la dosis hipotensora como con otra dosis no hipotensora. Desgraciadamente, no probaron la dosis baja en los experimentos de prevención. Posteriormente, Zierhut y cols. (1991) estudiaron el efecto del tratamiento crónico con ramipril, en el desarrollo de la hipertrofia ventricular inducida por una constricción en el arco de la aorta. La presión del ventrículo izquierdo fue similar en el grupo de las ratas con estenosis aórtica tratadas y sin tratar, y no se previno el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, a pesar de que la masa relativa del ventrículo izquierdo fue ligeramente menor en el grupo de los animales sometidos a una sobrepresión tratados con el IECA que sin tratar (diferencia no significativa). Más recientemente, también utilizando ramipril, y el mismo modelo de inducción de hipertrofia cardíaca que nosotros, Rhaleb y cols., (1994) han encontrado una prevención de la hipertrofia cardíaca con una dosis de ramipril capaz de disminuir la presión arterial, pero no con una dosis no hipotensora. La discrepancia de estos resultados y los nuestros con los obtenidos por Linz y cols. (1989a), puede sugerir que los mecanismos por los que los IECA actúan en la hipertrofia cardíaca sean distintos en la prevención que en la reversión, no pudiéndose separar en el primer caso la inhibición de la formación de angiotensina, de un efecto hemodinámico. Apoyando esta hipótesis se encuentran los resultados un tanto sorprendentes de Kromer y Riegger (1988), quienes utilizando un modelo de hipertrofia por constricción de la aorta ascendente en la rata, observaron que el tratamiento con un IECA desde el comienzo de la sobrecarga de presión no previno la aparición de hipertrofia cardíaca, pero cuando comenzaron el tratamiento más tarde, se redujo la hipertrofia. Los resultados obtenidos en esta Tesis utilizando una dosis no hipotensora de captopril, pero capaz de inhibir significativamente el ECA, sugieren que la disminución en la densidad de

$I_{to}$  encontrada en las células procedentes de corazones hipertróficos no está provocada por la AT II, sino que dependen más bien de la tensión a que han estado sometidos estos miocitos.

Los resultados utilizando una dosis alta de captopril, capaz de normalizar la presión arterial, demostraron una prevención de la hipertrofia cardíaca, la cual estuvo acompañada de una normalización de la densidad de la  $I_{to}$  a +60 mV. Del mismo modo, la conductancia máxima, medida en  $\mu S$  o en  $\mu S/pF$ , fue similar a la encontrada en las células aisladas de corazones controles, sin embargo observamos un desplazamiento en la curva de activación en estado estacionario hacia potenciales más positivos. Este hecho estuvo acompañado de un valor más bajo de la pendiente de la curva de activación comparado con la pendiente obtenida en células controles, acercándose más a las pendientes encontradas en células hipertróficas. Es decir, la  $I_{to}$  de células cardíacas aisladas de animales con estenosis aórtica tratados crónicamente con una dosis hipotensora de captopril, mostró un umbral de activación más despolarizado que las células normales sin tratamiento, aunque a potenciales aún más positivos alcanzaban valores similares. Esto indica que los miocitos aislados de estos corazones, en parte han preservado las características de la  $I_{to}$  de las células controles, pero no son del todo normales, puesto que a ciertos niveles de potencial, la  $I_{to}$  resulta disminuida. Es difícil explicar a qué pueda deberse este hecho, lo que sí podemos descartar es un efecto directo del captopril. El mecanismo de acción de los IECA es complicado y no se limita a la inhibición de la producción de la AT II. Puesto que estos fármacos también inhiben el enzima encargado de la degradación de la bradiquinina, estos corazones habrán estado expuestos a mayores niveles de este péptido. La BK ejerce la mayor parte de sus efectos fisiológicos y farmacológicos a través de su receptor  $B_2$ , y estas acciones dependen de la movilización de la cascada del ácido araquidónico y la generación de prostaglandinas y óxido nítrico (Gavras, 1994). También estos fármacos alteran el metabolismo, manteniendo los cambios adaptativos en la isoenzima creatín quinasa, lo que conduce a una mejor utilización de los fosfatos ricos en energía, a la vez que mejora la utilización de la glucosa (Gavras, 1994). Junto con estos factores, hay que indicar que el modelo de constricción aórtica que hemos utilizado induce un aumento de la renina circulante sólo durante los primeros días, pero luego vuelve a niveles normales (Mercadier



y cols., 1989) a pesar de la permanencia de la hipertensión. Sin embargo es posible que a nivel local, esté aumentada, y lo que sí estará elevado a consecuencia de la inhibición del ECA, es la AT I. Por todo ello, la composición del medio que rodea a los miocitos cardíacos está alterada en el tratamiento crónico con captopril, y la modificación encontrada en la cinética de la  $I_{to}$  puede ser debida a ello, aunque por estar normalizada la presión, la conductancia máxima permanece normal, lo que sugiere que el número de canales de  $I_{to}$  no resulta alterado.

El efecto de un desplazamiento de la curva de activación en estado estacionario, asumiendo que la curva de inactivación no se modifica, supone una disminución en la corriente de "ventana" de la  $I_{to}$ . Este efecto implica una disminución en la disponibilidad de los canales de esta corriente, por lo que su efecto se asemeja al de una disminución en la  $I_{to}$ . De esta manera, al disminuir la corriente de salida, la corriente neta de entrada aumenta, y podemos suponer un incremento en la duración del potencial de acción, que podría ser el responsable de la acción antiarrítmica observada por algunos investigadores en el tratamiento crónico con IECA (Webster y cols., 1985). Esta hipótesis sería compatible con los resultados obtenidos por Bashir y cols. (1992), quienes han observado que en pacientes con disfunción ventricular y taquicardia ventricular inducible, el tratamiento con captopril prolonga el período refractario del ventrículo, sin alterar el ritmo del nodo sinusal. Más aún, el hecho de que el tratamiento crónico con captopril, induzca una disminución en la disponibilidad de la  $I_{to}$ , y por lo tanto, un incremento de la duración del potencial de acción, podría implicar, (como se ha propuesto para explicar el efecto inotrópico positivo de la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica (Fedida y Bouchard, 1992)) que la corriente de calcio fluiría durante más tiempo, al encontrarse prolongada la meseta del potencial de acción. Este hecho incrementaría la entrada de calcio en la célula, por lo que la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico estaría aumentada, favoreciendo la contracción. Quizá este mecanismo esté implicado en la acción beneficiosa de los IECA en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (The Consensus trial study group, 1987).

## **6.- CONCLUSIONES**

---

---

- 1.- El ventrículo izquierdo del corazón de la rata es heterogéneo en cuanto a la duración del potencial de acción, la cual varía según la región anatómica considerada, correspondiendo la menor duración a las células procedentes de la región apical y la mayor duración al septum interventricular. Las células localizadas en la pared libre del ventrículo izquierdo muestran una duración intermedia, observándose en esta parte mayor variabilidad que en las otras dos localizaciones.
- 2.- Esta heterogeneidad fisiológica en la duración del potencial de acción, es consecuencia de las diferencias en la densidad de la corriente transitoria de salida de potasio, cuya densidad es dos o tres veces superior en la región apical o en la pared libre del ventrículo izquierdo que en septum respectivamente, y más variable en la región de la pared libre.
- 3.- En los corazones hipertróficos la duración del potencial de acción tiende a la homogeneización en todo el ventrículo izquierdo. En la región apical y en la pared libre la duración del potencial de acción se prolonga en los corazones hipertróficos, como consecuencia de la disminución en la densidad de la corriente transitoria de salida. En septum también se observó una disminución en la corriente transitoria que no fue acompañada de un aumento en la duración del potencial de acción. Este hallazgo podría explicarse por la aparición en las células hipertróficas de otra conductancia (probablemente de cloro) que contrarrestaría el enlentecimiento de la repolarización en esta localización ventricular donde la corriente transitoria es muy pequeña.
- 4.- El tratamiento crónico con captopril a una dosis que no afecta la presión arterial pero que inhibe de forma significativa el enzima de conversión de angiotensina, no es efectivo en la prevención del desarrollo de la hipertrofia cardíaca, como lo demuestra el hecho de que tanto los parámetros macroscópicos (ratio peso corazón/ peso corporal) como los microscópicos (densidad de la corriente transitoria) son similares a los obtenidos en el grupo de animales hipertróficos sin tratar.

- 5.- El tratamiento crónico con una dosis hipotensora de captopril impidió el desarrollo de hipertrofia en el 100% de los animales sometidos a estenosis aórtica. Las células procedentes de los animales tratados mostraron un desplazamiento de las curvas de activación hacia potenciales más positivos pudiendo este mecanismo estar implicado en las propiedades cardioprotectoras del captopril.

## **7.- BIBLIOGRAFIA**

---

---

- Aceto, JF & Baker: [Sar<sub>1</sub>]angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *Am J Physiol*, 1990; **258**: H806-H813.
- Alyono, D; Anderson, RW; Parish, DG; Dri, X & Bache, RJ: Alterations of myocardial blood flow associated with experimental canine left ventricular hypertrophy secondary to valvular aortic stenosis. *Circ Res*, 1986; **58**: 47-57.
- Antzelevitch, C; Sicouri, S; Litovski, SH; Lukas, A; Krishnana, SC; Di Diego, JM; Gintant, GA & Liu, DW: Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*, 1991; **69**: 1427-1449.
- Anversa, P; Loud, AV; Giacomelli, F & Wiener, J: Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. *Lab Inv*, 1978; **38**: 597-605.
- Anversa, P; Olivetti, G; Melissari, M & Loud, AV: Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat. *J Mol Cell Cardiol*, 1980; **12**: 781-795.
- Apkon, M; & Nerbonne, JM:  $\alpha_1$ -adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 8756-8760.
- Apkon, M; & Nerbonne, JM: Characterization of two distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, 1991; **97**: 973-1011.
- Arad, M; Shotan, A; Horowitz, L; Klein, R & Rabinowitz, B: Effects of captopril on metabolic and hemodynamic alterations in global ischemia and reperfusion in the isolated working rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 319-323.
- Aronson, RS: Characteristics of action potentials of hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ Res*, 1980; **47**: 443-454.
- Aronson, RS: Afterpotentials and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ Res*, 1981; **48**: 720-727.
- Aronson, RS & Nordin, C: Electrophysiologic properties of hypertrophied myocytes isolated from rats with renal hypertension. *Eur Heart J*, 1984; **5** (supplement F): 339-345.
- Atkinson, AB; Brown, JJ; Lever, AF; McAreavey, D; Robertson, JIS; Behan, PO; Melville, ID & Weir, AI: Neurological dysfunction in two patients receiving captopril and cimetidine. *Lancet*, 1980; **ii**: 36-37.
- Attwell, D; Eisner, D & Cohen, I: Voltage-clamp and tracer flux data: Effects of a restricted extracellular space. *Q Rev Biophys*, 1979; **12**: 213-261.
- Bache, RJ; Vrobel, TR; Ring, WS; Emergy, RW & Anderson, RW: Regional myocardial blood flow during exercise in dogs with chronic left ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 1981; **48**: 78-87.

- Bache, RJ: Effects of hypertrophy on the coronary circulation. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1988 Vol XXXI, No 6: 403-440.
- Bassinghwaighe, JB & Reuter, H: Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells. *Electrical Phenomena in the heart*, ed. WC de Mellopp., 1972; pp. 353-395. NY Acad.
- Baxck, PH & Marbán, E: Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*, 1993; **72**: 890-900.
- Bailey, BA & Houser, SR: Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy induced by slow progressive pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*, 1992; **24**: 365-373.
- Bailey, BA & Houser, SR: Sarcoplasmic reticulum-related changes in cytosolic calcium in pressure-overload-induced feline LV hypertrophy. *Am J Physiol*, 1993; **265**: H2009-H2016.
- Bainski, A; Nairn, AC; Grengard, P Gadsby, DC: Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature*, 1989; **340**: 718-721.
- Baker, KM; Chernin, MI; Wixson, SK & Aceto, JF: Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol*, 1990; **259**: H324-H332.
- Balser, JR; Bennett, PB & Roden, DM: Time-dependent outward current in guinea-pig ventricular myocytes: Gating of the delayed rectifier. *J Gen Physiol*, 1990; **96**: 835-864.
- Barrington, PL; Harvey, RD; Mogul, DJ; Basset, AL & Ten Eik, RE: Na current ( $i_{Na}$ ) and inward rectifying K current ( $i_{K1}$ ) in cardiomyocytes from normal and hypertrophic right ventricles of cat. *Biophys J*, 1988; **53**: 426 (abstr).
- Bartsova, D; Chvapil, M; Korecky, B; Poupa, O; Rakusan, K; Turek, Z & Vizec, M: The growth of the muscular and collagenous parts of the rat heart in various forms of cardiomegaly. *J Physiol (Lond.)*, 1969; **200**: 285-295.
- Bashir, Y; Sneddon, JF; O'Nunain, S; Paul, VE; Gibson, S; Ward, DE & Camm, AJ: Comparative electrophysiological effects of captopril or hydralazine combined with nitrate in patients with left ventricular dysfunction and inducible ventricular tachycardia. *Br Heart J*, 1992; **67**: 355-360.
- Bassett, AL & Gelband, H: Chronic partial occlusion of pulmonary artery in cats: Changes in ventricular action potential configuration during early hypertrophy. *Circ Res*, 1973; **32**: 15-26.
- Bean, BP: Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J Gen Physiol*, 1985; **86**: 1-30.

- Beeler, GW & Reuter, H: Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J Physiol*, 1977; **268**: 177-210.
- Beeler, GW & McGuigan, JAS: Voltage clamping of multicellular myocardial preparations: capabilities and limitations of existing method. *Prog Biophys Mol Biol*, 1978; **31**: 219-254.
- Beinlich, CJ; White, GJ; Baker, KM & Morgan, HE: Angiotensin II and left ventricular growth in newborn pig heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1991; **23**: 1031-1038.
- Belles, B; Hescheler, J & Trube, G: Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole-cell recordings and tolbutamide. *Pflügers Arch*, 1987; **409**: 582-588.
- Belles, B; Malécot, CO; Hescheler, J & Trautwein, W: "Run-down" of the calcium current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflügers Arch*, 1988; **411**: 353-360.
- Bénitah, JP; Bailly, P; D'Agrossa, MC; Da Ponte, JP; Delgado, C & Lorente, P: Slow inward current in single cells isolated from adult human ventricles. *Pflügers Arch*, 1992a; **421**: 176-187.
- Bénitah, JP; Bailly, P; Da Ponte, JP; De Riberolles, C & Lorente, P: Outward currents in isolated myocytes from human hypertrophied left ventricles. *Circulation*, 1992b; **86(suppl I)**: I-697.
- Bernardinelli, L & Isenberg, G: Isolated atrial myocytes: Adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol* 1983; **244**: H734-H737.
- Betolucchi, S & Chiarello, M: Effects of antihypertensive therapy on diastolic dysfunction in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19(suppl 5)**: S115-S121.
- Beuckelmann, DJ; Näbauer, M & Erdmann, E: Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*, 1993; **73**: 379-385.
- Biermans, G; Vereecke, J & Carmeliet, E: The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying K current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, 1987; **410**: 604-613.
- Bikkina, M; Larson, MG & Levy, D: Asymptomatic ventricular arrhythmias and mortality risk in subjects with left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 1993; **22**: 1111-1116.
- Bonow, RO; Rosing, DR & Bacharach, SL: Effects of verapamil on left ventricular relaxation time and regional left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 1981; **64**: 787-796.
- Bouron, A; Potreau, D & Raymond, G: The L type calcium current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res*, 1992; **26**:



662-670.

- Breisch, EA; White, EC; Nimmo, L & Bloor, CM: The interrelationship of coronary vascular structure and flow during pressure overload hypertrophy. *Circulation*, 1985; **72**: 76.
- Bretag, AH: Muscle chloride channels. *Physiol Rev*, 1987; **67**: 618-724.
- Brooksby, P; Levi, AJ & Jones, JV: The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertension*, 1993a; **11**: 611-622.
- Brooksby, P; Levi, AJ & Jones, JV: An investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res*, 1993b; **27**: 1268-1277.
- Bryant, SM; Ryder, KO & Hart, G: Effects of captopril on membrane current and contraction in single ventricular myocytes from guinea-pig. *Br J Pharmacol*, 1991; **102**: 462-466.
- Bugaisky, L & Zak, R: Biological mechanisms of hypertrophy. *The heart and cardiovascular system* ed by Fozzard et al. Raven Press, New York, 1986.
- Boyle, WA & Nerbonne, JM: A novel type of depolarization-activated K<sup>+</sup> current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am J Physiol*, 1991; **269**: H1235-H1247.
- Bouron, A; Potreau, D & Raymond, G: The L type calcium current in single hypertrophied cardiomyocytes from right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res*, 1992; **26**: 662-670.
- Cameron, JS; Kimura, S; Jackson-Burns, DA; Smith, DB & Basset, AL: ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are altered in hypertrophied ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1988; **255**: H1254-H1258.
- Campbell, SE; Korecky, B & Rakusan, K: Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res*, 1991; **68**: 984-996.
- Capasso, JM; Olivetti, G & Anversa, P: Mechanical and electrical properties of cardiomyopathic hearts of Syrian hamsters. *Am J Physiol*, 1989; **257**: H1836-H1842.
- Carmeliet, E: Function et pharmacologie des canaux potassiques dans le coeur et les vaisseaux. *Arch Mal Coeur*, 1992; **85**: 465-471.
- Carmeliet, E: K<sup>+</sup> channels in cardiac cells; mechanisms of activation, inactivation and K<sup>+</sup> sensitivity. *Pflügers Arch*, 1989; **414** (suppl 1):S88-S92.
- Cerbai, E; Ambrosio, G; Porciatti, F; Chiarello, M; Giotti, A & Mugelli, A: Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*, 1991; **84**: 1773-1782.

- Chassagne, C; Wisnewsky, C & Schwartz, K: Antithetical accumulation of myosin heavy chain but not  $\alpha$ -actin myna isoforms during early stages of pressure-overload-induced rat cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 1993; **72**: 857-864.
- Chen, SA; Chang, MS; Chiang, BN; Cheng, KK & Lin, CI: Electromechanical effects of angiotensin in human atrial tissues. *J Mol Cell Cardiol*, 1991; **23**: 483-493.
- Chien, KR; Knowlton, KU; Zhu, H & Chien, S: Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB Journal*, 1991; **5**: 3037-3046.
- Chililan, WM & Marcus, ML: Coronary vascular adaptations to myocardial hypertrophy. *Ann Rev Physiol*, 1987; **49**: 447-487.
- Chopra, M; Beswick, H; Clapperton, M; Dargie, HJ; Smith, WE & McMurray, J: Antioxidant effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: free radical and oxidant scavenging are sulfhydryl dependent, but lipid peroxidation is inhibited by both sulfhydryl- and nonsulfhydryl-containing ACE inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 330-340.
- Clark, RB; Giles, WR & Imaizumi, Y: Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol*, 1988; **405**: 147-168.
- Cleland, JFG; Dargie, HJ; Pettigrew, A; Gillen, G & Robertson, JIS: The effects of captopril on serum digoxin and urinary urea and digoxin clearances in patients with congestive heart failure. *Am Heart J*, 1986; **112**: 130-135.
- Clozel, JP & Hefti, F: Cilazapril prevents the development of cardiac hypertrophy and decrease of coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988; **11**: 568-572.
- Cohen, I; Giles, W & Noble, D: Cellular basis for the T wave of the electrocardiogram. *Nature*, 1976; **262**: 657-661.
- Cohen, I; Di Francesco, D; Pennefather, P : Internal and external  $K^+$  help gate the inward rectifier. *Biophys J*, 1989; **55**: 197-202.
- Coraboeuf, E & Carmeliet, E: Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch*, 1982; **392**: 352-359.
- Coraboeuf, E: Anomalies des mouvements ioniques dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques. *Therapie*, 1992; **47**: 171-179.
- Coulombe, A; Duclohier, H; Coraboeuf, E & Touzet, N: Single chloride-permeable channels of large conductance in cultured cardiac cells of new-born rats. *Eur Biophys J*, 1987; **14**: 155-162.

- Coulombe, A & Coraboeuf, E: Large-conductance chloride channels of new-born rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media. *Pflügers Arch*, 1992; **422**: 143-150.
- Coulombe, A; Momtaz, A; Richer, B; Swynghedauw, B & Coraboeuf, E: Reduction of calcium independent transient-outward current density in DOCA-salt hypertrophied rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, 1994; **427**: 47.
- Craelius, W; Chen, V & El Sherif, N: Stretch activated ion channels in ventricular myocytes. *Biosci Rep*, 1988, **8**: 407-414.
- Cruickshank, JM: Clinical importance of coronary perfusion pressure in the hypertensive patient with left ventricular hypertrophy. *Cardiology*, 1992; **81**: 283-290.
- Cushman, DW & Ondetti, MA: Personal and historical perspectives: History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, 1991; **17**: 589-592.
- Cutilletta, AF; Dowell, RT; Rudnik, M; Arcilla, RA & Zak, R: Regression of myocardial hypertrophy I. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen. *J of Mol and Cell Cardiol*, 1975; **7**: 767-781.
- Cutilletta, AF: Myosin heavy chain myna during the development and regression of myocardial hypertrophy. *Eur Heart J*, 1984; **5 (suppl F)**: 193-197.
- Danser, AHJ; van Kats, JP; Admiraal, PJJ; Derkx, FHM; Lamers, JMJ; Verdouw, PD; Saxena, PR & Schalekamp, MADH: Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*, 1994; **24**: 37-48.
- Dart, CH & Holloszy, JO: Hypertrophied non-failing rat heart: Partial biochemical characterization. *Circ Res*, 1969; **25**: 245-253.
- Deck, KA & Trautwein, W: Ionic currents in cardiac excitation. *Pflügers Arch*, 1964; **280**: 63-80.
- Di Bianco, RD: Adverse reactions with angiotensin converting enzyme inhibitors. *Med Toxicol*, 1986; **1**: 122-141.
- Di Francesco, D; Ferroni, A & Viscentin, S: Barium induced blockade of the inward rectifier in calf purkinje fibers. *Pflügers Arch*, 1984; **402**: 446-453.
- Doty, DB; Wright, CB; Hiratzka, LF; Eastham, CL & Marcus, ML: Coronary reserve in volume-induced right ventricular hypertrophy from atrial setal defect. *Am J Cardiol*, 1984; **54**: 1059-1065.
- Drummer, AO & Jarrott, B: The disposition and metabolism of captopril. *Med Res Rev*, 1986; **6**: 75-97.

- Dukes, IA & Morad, M: The transient K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes: evaluation of its Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> dependence. *J Physiol* 1991; **435**: 395-420.
- Duncia, JV; Chiu, AT; Carini, DJ; Gregory, GB; Johnston, AL; et al.: The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J Med Chem*, 1990; **33**: 1312-1329.
- Dzau, VJ & Re, RN: Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 1987; **73** (suppl I): I-34.
- Dzau, VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*, 1988; **77** (suppl I): I-4-I-13.
- Dzau, VJ & Pratt, RE: Cardiac, vascular, and intrarenal renin-angiotensin systems in normal physiology and disease. *The Renin-Angiotensin system*, ed. by Robertson, JIS & Nichols, MG. Gower Medical Publishing, 1993; 42.1-42.11.
- Eagle, KA; Blank, DJ; Aguiar, E & Firth, LM: Economic impact of regression of left ventricular hypertrophy by antihypertensive drugs. *J Hum Hypertens*, 1993; **7**: 341-351.
- Edwards, CRW & Panfield, PL: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Past, present and bright future. *Lancet*, 1985; **i**: 30-34.
- Eichstaedt, H; Danne, O; Langer, M; Cordes M; Schubert, C; Felix, R Schmutzler, H: Regression of left ventricular hypertrophy under Ramipril treatment investigated by nuclear magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989; **13**(suppl. 3): S75-S80.
- Enalapril Congestive Heart Failure Investigators: Long-term effects of enalapril in patients with congestive heart failure: a multicenter, placebo-controlled trial. *Heart Failure*, 1987; **3**(3): 102-107.
- Enous, R; Coetzee, WA & Opie, LH: Effects of the ACE inhibitor, perindoprilat, and of angiotensin II on the transient inward current of guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 17-23.
- Escande, D; Loisanee, D; Planche, C & Coraboeuf, E: Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. *Am J Physiol*, 1985; **249** (18): H843-H850.
- Escande, D: The pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the heart. *Pflügers Arch*, 1989; **414**(suppl 1): S93-S98.
- Fabiato, A: Calcium-induced release from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 1983; **245**: C1-C14.
- Fagard, R: Hypertensive heart disease: Pathophysiology and clinical and prognostic consequences. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**(suppl 5): S59-S66.

- Fatz, B & Katz, B: The electrical of crustacean muscle fibres. *J Physiol*, 1953; **120**: 171-204.
- Fedida, D; Shimoni, Y & Giles, WR: A novel effect of norepinephrine on cardiac cells is mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *Am J Physiol*, 1989; **256**: H1500-H1504.
- Fedida, D & Giles, WR: Regional variations in the action potential and transient outward currents in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol*, 1991; **442**: 191-209.
- Fedida, D & Bouchard, RA: Mechanisms for the positive inotropic effect of  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 1992; **71**: 673-688.
- Ferrario, CM: Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. *Drugs*, 1990; **39** (suppl. 2): 1-8.
- Ferry, DR & Kaumann, AJ: Relationship between  $\beta$ -adrenoceptor and calcium channels in human ventricular myocardium. *Br J Pharmacol*, 1987; **90**: 447-457.
- Fletcher, AE & Dollery, CT: Side effects associated with inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The Renin-Angiotensin system*, ed. by Robertson, JIS & Nichols, MG. Gower Medical Publishing, 1993; 99.1-99.15.
- Fouad, FM; Solominski, JM & Tarazi, RC: Left ventricular diastolic function in hypertension: Relation to left ventricular mass and systolic function. *Am Coll Cardiol*, 1984; **3**: 1500-1506.
- Fozzard, HA & Hellam, DC: Relationship between membrane voltage and tension in voltage cardiac clamped Purkinje fibers. *Nature*, 1968; **218**: 588-589.
- Fozzard, HA & Arnsdorf, MF: Cardiac electrophysiology. *The heart and cardiovascular system*. Ed by HA Fozzard et al. Raven Press. New York. 1986; pp: 1-29.
- Franz, MR; Bargheer, K; Rafflenbeul, W; Haverich, A & Lichtlen, PR: Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T Wave. *Circulation*, 1987; **75**: 379-386.
- Friel, DD & Bean, BP: Two ATP-activated conductances in bull-frog atrial cells. *J Gen Physiol*, 1988; **91**: 1-27.
- Frohlich, ED & Tarazi, RC: Is arterial pressure the sole factor responsible for hypertensive cardiac hypertrophy? *Am J Cardiol*, 1979; **44**: 959-963.
- Furukawa, T; Myerburg, RJ; Furukawa, N; Basset, AL & Kimura, S: Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res*, 1990a; **67**: 1287-1291.
- Furukawa, T; Myerburg, RJ; Furukawa, N; Kimura, S & Basset, AL: Ionic mechanism

of increased susceptibility of hypertrophy feline myocytes to metabolic inhibition. *Circulation*, 1990b; **82**(suppl III): III-522.

- Furukawa, T; Kimura, S; Cuevas, J; Furukawa N; Basset, AL & Myerburg, RJ: Role of cardiac ATP-regulated potassium channels in differential responses of endocardial and epicardial cells to ischemia. *Circ Res*, 1991; **68**: 1693-1702.

- Furukawa, T; Kimura, S; Furukawa N; Basset, AL & Myerburg, RJ: Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res*, 1992; **70**: 91-103.

- Gadsby, DC: The Na/K pump of cardiac myocytes. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, 1990; Ed by Zipes, DP & Jalife, J. WB Saunders Company.

- Garwitz, ET & Jones, AW: Aldosterone infusion into the rat and dose-dependent changes in blood pressure and arterial ionic transport. *Hypertension*, 1982; **4**: 374-381.

- Gavras, H: Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension*, 1994; **23**: 813-818.

- Gettes, LS & Reuter, H: Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol*, 1974; **240**: 703-724.

- Giles, WR & Imaizumi, Y: Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol*, 1988; **405**: 123-145.

- Grichois, ML; Blanc, J; Deckert, V & Elghozi, JL: Differential effects of enalapril and hydralazine on short-term variability of blood pressure and heart rate in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 863-869.

- Groel, JT; Tadros, SS; Dreslinski, GR & Jenkins, AC: Long term antihypertensive therapy with captopril. *Hypertension*, 1983; **5** (suppl 3): 141- 151.

- Grossman, D & Messerli, FH: End-organ disease in hypertension: What have we learned?. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **20** (suppl. 10): S1-S6.

- Gülch, RW; Baumann, R & Jacob, R: Analysis of myocardial action potential in left ventricular hypertrophy of Goldblatt rats. *Basic Res* 1979; **74**: 69-82.

- Gülch, RW: The effect of elevated chronic loading on the action potential of mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1980; **12**: 415-420.

- Gülch, RW: Electrophysiological properties of hypertrophied myocardium. *Perspectives in Cardiovascular Research*, 7, *Myocardial Hypertrophy and Failure*, ed by N.R. Alpert. Raven Press, New York, 1983.

- Hagiwara, N; Irisawa, H & Kameyama, M: Contribution of two types of calcium current

to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol (Lond.)*, 1988; **395**: 233-253.

- Hagiwara, N; Masuda, H; Shoda, M & Irisawa, H: Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*, 1992; **456**: 285-302.

- Haber, E: The role of renin-angiotensin system in normal and pathological cardiovascular homeostasis. *Circulation*, 1976; **54**: 849.

- Hall, AS; Tan, LB & Ball, SG: Inhibition of ACE/kinase-II, acute myocardial infarction, and survival. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 190-198.

- Hallopeau, M: Rétrécissement ventriculo-aortique. *Gaz Med Paris*, 1869; **24**: 683.

- Hamill, OP; Martu, A; Neher, H; Sakmann, B & Sigworth, FJ: Improved patch clamp technics for high-resolution current recording from cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 1981; **391**: 85-100.

- Hamrell, BB & Alpert, NR: Cellular basis of the mechanical properties of hypertrophied myocardium. *The Heart and Cardiovascular System 1507-1524*. Ed by HA Fozzard et al. Raven Press, New York. 1986.

- Hamrell, BB & Hultgren, PB: Reduced isotonic shortening in rabbit right ventricular pressure overload hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 1992; **24**: 133-147.

- Hansson, L; Dahlöf, B; Himmelmann, A & Svensson, A: Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of essential hypertension. *The Renin-Angiotensin system*, ed. by Robertson, JIS & Nichols, MG. Gower Medical Publishing, 1993; 91.1-91.24.

- Hart, G: Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 933-946.

- Harvey, RD & Ten Eik, RE: Characterization of the inward-rectifying potassium current in cat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, 1988; **91**: 593-615.

- Harvey, RD & Hume, JR: Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science*, 1989a; **244**: 983-985.

- Harvey, RD & Hume, JR: Isoproterenol activates a chloride current, not the transient outward current, in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1989b; **257**: C1177-C1181.

- Harvey, RD; Clark, GD & Hume, JR: Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential. *J Gen Physiol*, 1990; **95**: 1077-1102.

- Hathaway, DR & March, KL: Molecular cardiology: New avenues for the diagnosis and treatment of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 1989; **13**: 265-282.
- Hatt, PY; Berjal, G; Moravec, J & Swynghedauw, B: Hert failure: An electron microscopic study of the left ventricular capillary muscle in aortic insufficiency in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol*, 1970; **1**: 235-247.
- Hayashi, H & Shibata, S: Electrical properties of cardiac membrane of spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol*, 1974; **27**: 355-359.
- Hearse, DJ; Kusama, Y & Bernier, M: Rapid electrophysiological changes leading to arrhythmias in the aerobic heart: photosensitization studies with rose bengal-derived reactive oxygen intermediates. *Circ Res*, 1989; **65**: 146-153.
- Heller, LJ & Stauffer, EK: Altered electrical and contractile properties of hypertrophied cardiac muscle (SHR and DOCA treated WKY). *Fed Proc*, 1979; **38**: 975.
- Hemsworth, PD; Pallandi, RT & Campbell, TJ: Cardiac electrophysiological actions of captopril: lack of direct antiarrhythmic effects. *Br J Pharmacol*, 1989; **98**: 192-196.
- Hemwall, ED; Duthihh, V & Houser, SR: Comparison of slow response action potentials from normal and hypertrophied myocardium. *Am J Physiol*, 1984; **246**: H675-H682.
- Hess, P & Tsien, RW: Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature*, 1984; **309**: 453-456.
- Hess, P: Cardiac calcium channels. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, 1990; Ed by Zipes, DP & Jalife, J. WB Saunders Company.
- Hickson, RC; Hammons,GT & Holloszy, JO: Development and regression of exercise-induced hypertrophy in the rat. *Am J Physiol*, 1989; **256**: H268-H272.
- Hille, B: Calcium channels, *Ionic Channels in excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 1984; pp: 76-98.
- Hill, JA; Coronado, R & Strauss, HC: Reconstitution of ionic channels from human heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1989; **21**: 315-322.
- Hiraoka, M & Kawano, S: Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol*, 1989; **410**: 187-212.
- Hirsch, AT; Talsness, CE; Schunkert, H; Paul, M & Dzau, VJ: Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res*, 1991; **69**: 475-482.
- Hodgkin, AL & Huxley, AF: A quantitative description of membrane current and its



application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 1952; **117**: 500-544.

- Hodsman, GP; Sumithran, E; Harrison, RW & Johnston, CI: Cardiac hypertrophy and salt status in chronic myocardial infarction in the rat: effects of enalapril versus salt restriction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988; **12**: 467-472.

- Horie, M; Hwang, TC & Gadsby, DC: Pipette GTP is essential for receptor-mediated regulation of Cl<sup>-</sup> current in dialysed myocytes from guinea-pig ventricle. *J Physiol*, 1992; **455**: 235-246.

- Houser, SR; Kleiman, RB & Nuss, H: Calcium currents in hypertrophied feline myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1989; **21**(suppl III): S-12.

- Hume, JR & Harvey, RD: Chloride conductance pathways in heart. *Am J Physiol*, 1991; **261**: C399-C412.

- Izumo, S; Lompré, AM; Matsuoka, R; Koren, G; Schwartz, K; Nadal-Guinard, B & Mahdavi, V: Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 1987; **79**: 970-977.

- Johnston, CI; Mendelson, FAO; Cubela, RB; Jackson, B; Kohzuki, M & Fabris, B: Inhibition of converting enzyme (ACE) in plasma and tissues: Studies *ex-vivo* after administration of ACE inhibitors. *J Hypertens*, 1988; **6**(suppl 3): S17-S22.

- Johnston, CI: Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs*, 1990; **39** (suppl. 1): 21-31.

- Johnston, CI; Mooser, V; Sun, Y & Fabris, B: Changes in cardiac angiotensin converting enzyme after myocardial infarction and hypertrophy in rats. *Clin Exper Pharmac Physiol*, 1991; **18**: 107-110.

- Johnston, CI: Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *The Renin-Angiotensin system*, ed. by Robertson, JIS & Nichols, MG. Gower Medical Publishing, 1993; 87.1-87.15.

- Josephson, IR; Sánchez-Chapula, J; & Brown, AM: A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ Res*, 1984a; **54**: 144-156.

- Josephson, IR; Sánchez-Chapula, J; & Brown, AM: Early outward current in rat single ventricular cells. *J Physiol*, 1984b; **54**: 157-162.

- Isenberg, G: Cardiac Purkinje fibers. Cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents. *Pflügers Arch*, 1976; **365**: 99-106.

- Isenberg, G & Klöckner, U: Glycocalyx is not required for slow inward calcium current isolated rat myocytes. *Nature*, 1980; **284**: 358-360.

- Isenberg, G & Klöckner, U: Calcium Currents of Isolated Bovine Ventricular Myocytes are Fast and of Large Amplitude. *Pflügers Arch*, 1982; **395**: 30-41
- Kahlirallah, PA & Kanabus, J: Angiotensin and myocardial protein synthesis. Tarazi RC, Dunbar JB eds. *Perspectives in cardiovascular research*. New York: Raven Press, 1983; 337-347.
- Kannel, WB; Gordon, T & Offutt, D: Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram: Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann Intern Med*, 1969; **71**: 89-101.
- Kannel, WB: Role of blood pressure in cardiovascular morbidity and mortality. *Prog Cardiovasc Dis*, 1974; **17**: 5-24.
- Kannel, WB; Doyle, JT, McNamara, PM, Quickenton, P & Gordon, T: Precursors of sudden coronary death: Factors related to the incidence of sudden death. *Circulation*, 1975; **51**: 606-613.
- Kannel, WB & Cobb, J: Left ventricular hypertrophy and mortality - results from the Framingham study. *Cardiology*, 1992; **81**: 291-298.
- Katz, AM: Cellular mechanisms in congestive heart failure. *Am J Cardiol*, 1988; **62**: 3A-8A.
- Katz, AM: Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *New Engl J Med*, 1990; **322** No. 2: 100-110.
- Kaufmann, RL; Homburger, H & Wirth, H: Disorder in excitation-contraction coupling of cardiac muscle from cats with experimentally produced right ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 1971; **28**: 346-357.
- Kayar, SR & Weiss, HR: Diffusion distances, total capillary length and mitochondrial volume in pressure-overload myocardial hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 1992; **24**: 1155-1166.
- Kent, RL; Hooper, JK & Cooper, G: Load responsiveness of protein synthesis in adult mammalian myocardium: Role of cardiac deformation linked to sodium influx. *Circ Res*, 1989; **64**: 74-85.
- Kenyon, JL & Gibbons, WR: Effect of low chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol*, 1977; **70**: 635-660.
- Kenyon, JL & Gibbons, WR: 4-aminopyridine and the transient outward current of sheep cardiac Purkinje fibres. *J Gen Physiol*, 1979; **73**: 139-157.
- Keung, ECH & Aronson, RS: Non-uniform electrophysiological properties and electrotonic

interaction in hypertrophied rat myocardium. *Circ Res*, 1981; **49**: 259-158.

- Keung, ECH; Keung, CS & Aronson, RS: Passive electrical properties of normal and hypertrophied rat myocardium. *Am J Physiol*, 1982; **243**: H917-H926.

- Keung, ECH; Berg, R & Katzung, BG: Effects of myocardial hypertrophy on transient outward current,  $I_A$ . *Circulation*, 1987; **76**(suppl IV): IV-237.

- Keung, EC: Calcium Current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res*, 1989; **64**: 753-763.

- Kilborn, MJ & Fedida, D: A study of the developmental changes in outward current of rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 1990; **430**: 37-60.

- Kim, D & Claphan, DE: Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science*, 1989; **244**: 1174-1176.

- Kimura, S; Basset, AL; Kohya, T; Kozlovskis, PL & Myerburg, RJ: Simultaneous recording of action potentials from endocardium and epicardium during ischemia in the isolated cat ventricle: Relation of temporal electrophysiologic heterogeneities to arrhythmias. *Circulation*, 1986; **74**: 401-409.

- Kimura, S; Basset, AL; Kohya, T; Kozlovskis, PL & Myerburg, RJ: Regional effects of verapamil on recovery of excitability and conduction time in experimental ischemia. *Circulation*, 1987; **76**: 1146-1154.

- Kimura, S; Basset, AL; Furukawa, T; Furukawa, N & Myerburg, RJ: Differences in the effect of metabolic inhibition on action potentials and calcium currents in endocardial and epicardial cells. *Circulation*, 1991; **84**: 768-777.

- Kimura, S; Basset, AL; Xi, H; Tomita, F & Myerburg, RJ: Different characteristics of  $Na^+$  currents in endocardial and epicardial cells. *Circulation*, 1992; **86**(suppl I): I-565.

- Kira, Y; Kochel, PJ; Gordon, EE & Morgan, HE: Aortic perfusion pressure as a determinant of cardiac protein synthesis. *Am J Physiol*, 1984; **246**: C247-C258.

- Kirsch, GE & Brown, AM: Cardiac sodium channels. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, 1990; Ed by Zipes, DP & Jalife, J. WB Saunders Company.

- Kleiman, RB & Houser, SR: Calcium currents in normal and hypertrophied isolated feline myocytes. *Am J Physiol*, 1988; **255**: H1434-H1442.

- Kleiman, RB & Houser, SR: Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J of Physiol*, 1989; **256**: H1450-H1461.

- Klocke, FJ: Measurements of coronary flow reserve: Defining patho-physiology versus making decisions about patient care. *Circulation*, 1987; **76**: 1183-1189.
- Kohlhardt, M; Krause, H; Kubler, M & Herdey, A: Kinetics of inactivation and recovery of the slow inward current in the mammalian ventricular myocardium. *Pflügers Arch*, 1975; **355**: 1-17.
- Kohya, T; Kimura, S; Myerburg, RJ & Basset, AL: Susceptibility of hypertrophied rat hearts to ventricular fibrillation during acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 1988; **20**: 159-168.
- Komajda, M & Grosgeat, Y: Myocardiopathies. In *Hypertrophie et insuffisance cardiaque*. Ed by Swynghedauw, B. INSERM/John Libbey Eurotext, London-paris. 1990; pp 505-519.
- Konstam, MA; Rousseau, MF; Kronenberg, MW; et al.: Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. *Circulation*, 1992; **86**: 431-438.
- Krishnan, SC & Antzelevitch, C: Sodium channel block produces opposite electrophysiological effects in canine ventricular epicardium and endocardium. *Circ Res*, 1991; **69**: 277-291.
- Kromer, EP & Riegger, AJ: Effects of long-term angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial hypertrophy in experimental aortic stenosis in the rat. *Am J Cardiol*, 1988; **62**: 161-163.
- Kunapuli, K & Kumar, A: Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its myna in the rat heart. *Circ Res*, 1987; **60**: 786-790.
- Kurachi, Y: Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular membrane of guinea-pig heart. *J Physiol*, 1985; **366**: 365-385.
- Kurachi, Y; Ito, H; Sugimoto, T; Shimizu, T; Miki, I & Ui, M: Alpha adrenergic activation of the muscarinic potassium channel is mediated by arachidonic acid metabolites. *Pflügers Arch*, 1989; **414**: 102-104.
- Lauer, MS; Anderson, KM; Kannel, WB & Levy, D: The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA*, 1991; **266**: 231-236.
- Lederer, JW & Nichols, CG: Nucleotide modulation of the activity of the rat heart ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in isolated membrane patches. *J Physiol*, 1989; **419**: 193-211.
- Lee, KS & Tsien, RW: Reversal of current through calcium channels in dialyzed single heart cells. *Nature*, 1982; **297**: 500.
- Lefevre, IA; Coulombe, A; Coraboeuf, E: The calcium antagonist D600 inhibits calcium-

independent transient outward current in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 1991; **432**: 65-80.

- Leighton, J; Merkow, L & Locker, M: Alteration in the size of the heart of late chick embryo after incubation at various temperatures. *Nature*, 1964; **201**: 198-199.

- Limas, C & Limas, CJ: Influence of thyroid status on intracellular distribution of cardiac adrenoceptors. *Circ Res*, 1987; **61**: 824-828.

- Lin, H; Katele, KV & Grimm, AF: Functional morphology of the pressure- and volume-hypertrophied rat heart. *Circ Res*, 1977; **41**: 830-836.

- Lindpaintner, K; Jin, M; Wilhem, MJ; Suzuki, F; Linz, W; Schölkens, BA & Ganten, D: Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation*, 1988; **77** (suppl D): I-18-I-23.

- Lindpaintner, K; Jin, M; Niedermaier, N; Wilhem, MJ & Ganten, D: Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart, *Circ Res*, 1990; **67**: 564-573.

- Lindpaintner, K & Ganten, D: The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res*, 1991; **68** (No. 4): 905-921.

- Linz, W; Schölkens, BA & Han YF: Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1986; **8**(suppl 10): S91.

- Linz, W; Schölkens, BA & Ganten, D: Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin. and Exper. Hyper.-Theory and Practice*, 1989a; **AII(7)**: 1325-1350.

- Linz, W; Schölkens, BA; Kaiser, J; Just, M; Bei-Yin, Q; Albus, U & Petry, P: Cardiac arrhythmias are ameliorated by local inhibition of angiotensin formation and bradykinin degradation with the converting-enzyme inhibitor ramipril. *Cardiovasc Drugs Therapy*, 1989b; **3**: 873-882.

- Litwin, SE; Litwin, CM; Raya, TE; Warner, AL & Goldman S: Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation*, 1991; **83**: 1028-1037.

- Litwin, SE & Morgan, JP: Captopril enhances intracellular calcium handling and  $\beta$ -adrenergic responsiveness of myocardium from rats with postinfarction failure. *Circ Res*, 1992; **71**: 797-807.

- Liu, DW; Gintant, GA & Antzelevitch, C: Ionic basis for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res*, 1993; **72**: 671-687.

- Lorell, BH; Wexler, LF; Momomura, S; Weinberg, E & Apstein, CS: The influence of pressure overload left ventricular hypertrophy on diastolic properties during hypoxia in isovolumically contracting rat hearts. *Circ Res*, 1986; **58**: 653-663.
- Lortet, S; Zimmer, HZ & Rossi, A: Inotropic response of the rat heart during development and regression of triiodothyronine-induced hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989; **14**: 707-712.
- Luk, HN & Carmeliet, E: Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in cardiac cells: rectification, open probability, block and role in digitalis toxicity. *Pflügers Arch*, 1990; **416**: 766-768.
- Magrini, F; Reggiani, P; Fratianni, A & Zanchetti, A: Acute effects of cilazapril on coronary hemodynamics in patients with renovascular hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**(suppl 5): S128-S133.
- Mahler, GM: Developmental increases in the inwardly rectifying potassium current of rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1992; **262**: C1266-C1272.
- Mann, DL; Urabe, Y; Kent, RL; Vinciguerra, S & Cooper IV, G: Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Circ Res*, 1991; **68**: 402-415.
- Manolio, TA; Levy, D; Garrison, RJ; Castelli, WP & Kannel, WB: Relation of alcohol intake to left ventricular mass: The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*, 1991; **17**: 717-721.
- Mansier, P; Chevalier, B; Mayoux, E; Charlemagne, D & Ollivier, L; Callens-El Amrani, F; Swynghedauw, B: Membrane proteins of the myocytes in cardiac overload. *Br J Clin Pharmacol*, 1990; **30**: 43S-48S.
- Martin, CL & Chin, K: Contribution of delayed rectifier and inward rectifier to repolarization of the action potential: Pharmacologic separation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 830-837.
- Martin, AF; Robinson, DC & Dowell, RT: Isomyosin and thyroid hormone level in pressure-overloaded weanling and adult rat hearts. *Am J Physiol*, 1985; **284**: H305-H310.
- Marty, A & Neher, E: Tight-seal whole-cell recording. *Single channel recording*, 1983; Ed by Sakmann, B & Neher, E. Plenum Press, New York.
- Matsuda, H: Open-state substructure of inward rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol*, 1988; **397**: 237-258.
- Matsuura, H & Ehara, T: Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells. *Circ Res*, 1992; **70**: 851-855.

- Mayoux, E; Callens, F; Swynghedauw, B & Charlemagne, D: Adaptational process of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channels to pressure overload: Biochemical and physiological properties of the dihydropyridine receptors in normal and hypertrophied rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988; **12**: 390-396.
- McDonald, TF: The slow inward calcium current in the heart. *Ann Rev Physiol*, 1982; **44**: 425-434.
- McDonald, TF; Cavalié, A; Trautwein, W & Pelzer, D: Voltage-dependent properties of macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, 1986; **406**: 437-448.
- Mc Lenachan, J; Henderson, E; Morris, K & Dargie, H: Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*, 1987; **317**: 787-792.
- Meerson, FZ: The myocardium in hyperfunction, hypertrophy, and heart failure. *Circ Res*, 1969; **25 (II)**: II-1-II-8.
- Meissner, G: Calcium release and monovalent ion channels in sarcoplasmic reticulum. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, 1990; Ed by Zipes, DP & Jalife, J. Pp:70-76. WB Saunders Company.
- Mercadier, JJ; Samuel, JL; Michel, JB; Zongazo, MA; de la Bastie, D; Lompré, AM; Wisnewsky, C; Rappaport, L; Levy, B & Schwartz, K: Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension. *Am J Physiol*, 1989; **257**: H979-H987.
- Millan, MA; Jacobowitz, DM; Aguilera, G & Catt, KJ: Differential distribution of  $\text{AT}_1$  and  $\text{AT}_2$  angiotensin II receptors subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 11440-11444.
- Mitchell, MR; Powel, T; Terrar, DA & Twist, VW: Strontium, nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *Br J Pharmacol*, 1984; **81**: 551-556.
- Mitra, R & Morad, M: Two types of calcium channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **93**: 5340-5344.
- Mochizuki, T; Eberli, FR; Apstein, CS & Lorell, BH: Exacerbation of ischemic dysfunction by angiotensin II in red cell-perfused rabbit hearts: effects on coronary flow, contractility, and high energy phosphate metabolism. *J Clin Invest*, 1992; **89**: 490-498.
- Morgan, HE; Gordon, EE; Kira, Y; Chua, BHL; Russo, LA; Peterson, CJ; McDermott, PJ & Watson, PA: Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 1987; **49**: 533-543.

- Motz, WH; Scheler, S & Strauer, BE: Medical repair of hypertensive left ventricular remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **20**(suppl 1): S32-S36.
- Mulvany, MJ: Changes to the vascular system resulting from hypertension and their effects on response to therapy. *Drugs*, 1990; **39**(suppl 1): 9-20.
- Murdoch, D & McTavish, D: Fosinopril. A review of its Pharmacodynamic properties, and therapeutic potential in essential hypertension. *Drugs*, 1992; **43**(1): 123-140.
- Näbauer, M; Beuckelmann, DJ & Erdmann, E: Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*, 1993; **73**: 386-394.
- Neher, E & Sakmann, B: Single channel current recorded from membrane of denervated frog muscle. *Nature*, 1976; **260**: 799-802.
- Nelissen-Vranken, HJMG; Struijker-Bousier, HAJ & Smits, JFM: Renal hemodynamic effects of nonhypotensive doses of angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension and heart failure rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 163-168.
- Niggli, E & Lederer, WJ: Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature*, 1991; **346**: 621-624.
- Nikolic, G; Bishop, RL & Singh, JB: Sudden death recorded during Holter monitoring. *Circulation*, 1982; **66**: 218-225.
- ?Nishimura, H; Kubo, S; Ueyama, S; Kubota, J & Kawamura, K: Peripheral hemodynamic effects of Captopril in patients with congestive heart failure. *Am Heart J*, 1989; **117**: 100-105.
- Nordin, C; Siri, F & Aronson, RS: Electrophysiologic characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1989; **21**: 729-739.
- Nuss, HB & Houser, SR: Voltage dependence of contraction and calcium current in severely hypertrophied feline ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1991; **23**: 717-726.
- Nuss, HB & Houser, SR: T-type calcium currents is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res*, 1993; **73**: 777-782.
- Owen, GK & Reidy, MA: Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Circ Res*, 1985; **57**: 695-705.
- Page, E & McCallister, IP: Quantitative description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied, and thyroxine-stimulated heart. *Am J Cardiol*, 1973; **31**: 172-181.



- Pahor, M; Gambassi, G & Carbonin, P: Antiarrhythmic effects of ACE inhibitors: a matter of faith or reality?. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 173-182.
- Pennefather, P & Cohen, IS: Molecular mechanisms of cardiac K<sup>+</sup>-channel regulation. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, 1990; Ed by Zipes, DP & Jalife, J. Pp: 17-28. WB Saunders Company.
- Pennefather, P; Oliva, C & Murline, N: Origin of the potassium and voltage dependence of the cardiac inward rectifying K-current (I<sub>K1</sub>). *Biophys J*, 1992; **61**: 448-462.
- Peper, J & Trautwein, A: A membrane current related to the plateau of the action potential of Purkinje fibers. *Pflügers Arch*, 1968; **303**: 108-123.
- Peters, KG; Wangler, RD; Tomanek, RJ & Marcus, ML: Effects of long-term cardiac hypertrophy on coronary vasodilator reserve in SHR rats. *Am J Cardiol*, 1984; **54**: 1342-1348.
- Pfeffer, JM; Pfeffer, MA; Mirsky, I & Braunwald, E: Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; **79**: 3310-3314.
- Pfeffer, JM; Pfeffer, MA; Mirsky, Iwai, J: Cardiac hypertrophy and performance of Dahl hypertensive rats on graded salt diets. *Hypertension*, 1984; **6**: 475-481.
- Primot, I; Mayoux, E; Oliviero, P & Charlemagne, D: Effect of pressure overload on cardiac Ca<sub>2+</sub> antagonist binding sites of guinea-pig. Comparison with the adaptational response of the hypertrophied rat heart. *Cardiovasc Res*, 1991; **25**: 875-880.
- Przyklenk, K & Kloner, RA: Angiotensin converting enzyme inhibitors improve contractile function by different mechanisms of action. *Am Heart J*, 1991; **121**: 1319-1330.
- Pye, MP & Cobbe, SM: Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 1992; **26**: 740-750.
- Räcke, HF; Koppers, D; Lemke, P; Casaretto, H & Hauswirth, O: Fosinoprilate prolongs the action potential: reduction of i<sub>K</sub> and enhancement of the L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 201-208.
- Rappaport, L; Swynghedauw, B & Mercadier, JJ: Physiological adaptation of the heart to pathological overloading. *Fed Proc*, 1986; **45**: 2573-2579.
- Raya, TE; Gay, RG; Aguirre, M & Goldman, S: Importance of venodilatation in prevention of left ventricular dilatation after chronic large myocardial infarction in rats: A comparison of captopril and hydralazine. *Circ Res*, 1989; **69**: 330-337.

- Re, R & Rovigatti, UR: New approaches to the study of the cellular biology of the cardiovascular system. *Circulation*, 1988; **77** (suppl. I): I-14.
- Rembert, JC; Kleinman LH; Fedor, JJ; Wechsler, AS & Greenfield, JC: Myocardial blood flow distribution in concentric left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*, 1978; **62**: 376-386.
- Reuter, H: Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Progr Biophys Mol Biol*, 1973; **26**: 1-43.
- Reuter, H & Scholz, H: A Study of the Ion Selectivity and the Kinetic Properties of the Calcium Current in Mammalian Cardiac Muscle. *J Physiol (Lond)*, 1977; **264**: 17-47
- Ribuoat, C; Cardinal, R; Gouin, L; Moreau, P; Godin, D; Vermeulen, M; Champlain, J; Rochette, L & Nadeau, R: Prolongation by captopril of action potential duration in the normal and hypertrophied rat ventricle: direct action or inhibition of the local angiotensin converting enzyme?. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 221-227.
- Rhaleb, NE; Yang, XP; Scicli, G & Carretero: Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. *Hypertension*, 1994; **23**: 865-868.
- Richard, S; Tiaho, F; Charnet, P; Nargeot, J & Nerbonne, JM: Two components of high threshold  $Ca^{++}$ -current modulated differentially by physiological stimuli. *Am J Physiol*, 1990; **258**: H1872-H1881.
- Richard, S; Charnet, P & Nerbonne, JM: Interconversion between distinct gating pathways of the high threshold calcium channel in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 1993; **462**: 197-228.
- Richer, C; Mulder, P; Fornes, P; Domergue, V; Heudes, D & Giudicelli, JF: Long-term treatment withtrandolapril opposes cardiac remodeling and prolongs survival after myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **20**: 147-156.
- Rossi, MA & Peres, LC: Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J*, 1992; **124** (3): 700-709.
- Rossner, KL & Sachs, HG: Electrophysiological study of Syrian hamster hereditary cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 1978; **12**: 436-443.
- Ryder, KO; Bryant, SM; Winterton, SJ; Turner, MA; Flores, NA; Sheridan, DJ & Hart, G: Electrical and mechanical characteristics of isolated ventricular myocytes from guinea-pigs with left ventricular hypertrophy and congestive heart failure. (Abstract) *J Physiol*, 1991; **438**: 181P.
- Ryder, KO; Bryant, SM & Hart, G: Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea-pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc Res*, 1993; **27**: 1278-1287.

- Saavedra, JM; Viswanathan, M & Shigematsu, K: Localization of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors in the rat heart conduction system. *Eur J Pharmacol*, 1993; **235**: 301-303.
- Sakman, B & Trube, G: Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig. *J Physiol*, 1984; **347**: 641-657.
- Sanguinetti, MC & Jurkiewicz, NK: Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current: Differential sensitivity to block by class II antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*, 1990; **96**: 195-215.
- Saxena, PR: Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous system. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19 (suppl 6)**: S80-S88.
- Saxon, ME & Safronova, VG: The rest-dependent depression of action potential duration in rabbit myocardium and the possible role of the transient outward current. A pharmacological analysis. *J Physiol (Paris)*, 1982; **78**: 461-466.
- Scamps, F; Mayoux, E; Charlemagne, D & Vassort, G: Calcium current in single cells isolated from normal and hypertrophied rat heart. Effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Circ Res*, 1990; **67**: 199-208.
- Scheel, KS & Williams, SE: Hypertrophy and coronary collateral vascularity in dogs with severe chronic anemia. *Am J Physiol*, 1985; **249**: H1032-H1037.
- Schelling, P; Fischer, H & Ganten, D: Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?. *J Hypertension*, 1991; **9**: 3-15.
- Schölkens, BA & Linz, W: Cardioprotective effects of ACE inhibitors: Experimental proof and clinical perspectives. *Clin Physiol Biochem*, 1990; **8 (suppl. 1)**: 33-43.
- Schouten, VJA; Vliegen, HW; Van der Larse, A & Huysmans, HA: Altered calcium handling at normal contractility in hypertrophied rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1990; **22**: 987-998.
- Schunkert, H; Dzau, VJ; Tang, SS; Hirsch, AT; Apstein, C & Lorell, B: Increased rat cardiac angiotensin-converting enzyme activity and myna levels in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *J Clin Invest*, 1990; **86**: 1913-1920.
- Schunkert, H; Jackson, B; Tang, SS & Lorell, BH: Localization and functional significance of cardiac ACE in hypertrophied rat hearts. *Circulation*, 1991; **84 (suppl II)**: II-307.
- Schuartz, K; De la Bastie, D; Bouveret, P; Oliviero, P; Alonso, S & Buckingham, M:  $\alpha$ -Skeletal muscle actin mRNAs accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res*, 1986; **59**: 551-555.

- Schwartz, K; Boheler, KR; De la Bastie, D; Lompré, AM & Mercadier, JJ: Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *Am J Physiol*, 1992; **262**: R364-R369.
- Sechi, LA; Griffin, CA; Grady, EF; Kalinyak, JE & Schambelan, M: Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res*, 1992; **71**: 1482-1489.
- Seifter, JL & Aronson, PS: Properties and physiologic roles of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. *J Clin Invest*, 1986; **78**: 859-864.
- Sen, S & Hollinger, C: A factor that may initiate myocardial hypertrophy in hypertension. *Circulation*, 1983; **68** (suppl. III): 224.
- Sen, S; Tarazi, RC; Khalirallah, PA & Bumpus, FM: Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 1974; **35**: 775-781.
- Sen, S; Tarazi, RC; Bumpus, FM: Biochemical changes associated with development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 1976; **10**: 254-261.
- Sen, S; Tarazi, RC; Bumpus, FM: Cardiac hypertrophy and antihypertensive therapy. *Cardiovasc Res*, 1977; **11**: 427-433.
- Sen, S; Tarazi, RC; Bumpus, FM: Reversal of myocardial hypertrophy and influence of adrenergic system. *Circulation*, 1980; **62**: 121.
- Severs, NS; Slade, AM; Powell, T; Twist, VW & Warren, RL: Correlation of ultrastructure and function in calcium-tolerant myocytes isolated from the adult rat heart. *J Ultrastruct Res* 1982; **81**: 222-239.
- Shah AK; Cohen, IS & Datyner, NB: Background K<sup>+</sup> current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J*, 1987; **52**: 519-525.
- Shibasaki, T: Conductance and kinetics of delayed rectifier channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol*, 1987; **387**: 227-250.
- Sicouri, S & Antzelevitch, C: A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res* 1991; **68**: 1729-1741.
- Siegelbaum, SA & Tsien, RW: Calcium-activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*, 1980; **299**: 485-506.
- Simpson, P; McGrath, A & Savion, S: Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res*, 1982; **51**: 787-801.
- Smith, RD; Chiu, AT; Wong, PC; Herblin, WF Timmermans, MWM: Pharmacology of

nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992; **32**: 135-165.

- Sorota, S: Swelling-induced chloride-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method. *Circ Res*, 1992; **70**: 679-687.

- Spann, JF: Heart failure and ventricular hypertrophy: altered cardiac contractility and compensatory mechanisms. *Am J Cardiol*, 1969; **23**: 504-509.

- Stanfield, PR; Standen, NB; Leech, CA; Ashcroft, FM: Inward rectification in skeletal muscle fibres. Molecular and cellular aspects of muscle function. *Adv Physiol Sci*, 1980; **5**: 247-262.

- Strobeck, JE & Sonneblich, EH: Myocardial contractile properties and ventricular performance. *The Heart and Cardiovascular System*, ed. by HA Fozzard et al. Raven Press, New York, 1986.

- Subissi, A; Criscuoli, M; Sardelli, G; Guelfi, M & Giachetti, A: Pharmacology of idrapril: a new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **20**: 139-146.

- Surawicz, B: Role of potassium channels in cycle length dependent regulation of action potential duration in mammalian cardiac purkinje and ventricular muscle fibres. *Cardiovasc Res*, 1992; **26**: 1021-1029.

- Swynghedauw, B; Moalic, JM; Bouveret, P; Bercovici, J; De la Bastie, D & Schwartz, K: Messenger RNA content and complexity in normal and overloaded rat heart. *Eur Heart J*, 1984; **5** (suppl F): 211-218.

- Swynghedauw, B; Moalic, JM; Delcayre, C: Genèse de l'hypertrophie cardiaque. Induction mécanique et changements transitoires de l'expression du génome. Signaux de croissance. Synthèse des protéines, du RNA et du DNA. Hypertrophie et insuffisance cardiaque. Ed. Swynghedauw, B. Pp 505-519. INSERM/John Libbey Eurotext, London-Paris, 1990.

- Tabrizchi, R & Triggle, CR: The interrelationship between the effects of captopril and nifedipine on pressor responses elicited by selective  $\alpha$ -adrenoceptor agonists in the pithed rat preparation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 562-567.

- Talifah, K; Briden, KL & Weiss, HR: Thyroxine-induced hypertrophy of the rabbit heart: Effect of regional oxygen extraction, flow, and oxygen consumption. *Circ Res*, 1983; **52**: 272-277.

- Tarazi, RC: The heart in hypertension. *N Eng J Med*, 1985; **312**: 308-390.

- Ten Eik, RE; Bassett, AL & Robertson, LL: Possible electrophysiological basis for decreased contractility associated with myocardial hypertrophy in the cat: a voltage clamp

approach. *Perspectives in cardiovascular research. Myocardial hypertrophy and failure*, 1983; Ed by Alpert, NR; New York, Raven. 7: 245-359.

- The Consensus trial study group: Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure. *N Eng J Med*, 1987; **316**: 1429-1435.

- Thollon, C; Kreher, P; Charlon, V & Rossi, A: Hypertrophy induced alteration in action potential and effects of the inhibition of angiotensin converting enzyme by perindompril in infarcted rat hearts. *Cardiovasc. Res.*, 1989; **23**: 224-230.

- Tiaho, F; Nargeot, J & Richard, S: Repriming of L-type calcium currents revealed during early whole-cell patch-clamp recordings in rat ventricular cells. *J Physiol*, 1993; **463**: 367-389.

- Tourneur, Y; Mitra, R; Morad, M & Rougier, O: Activation properties of the inward-rectifying potassium channel on mammalian heart cells. *J Membr Biol*, 1987; **97**: 127-135.

- Trautwein, W: Membrane currents in cardiac muscle fibers. *Physiol Rev*, 1973; **53**: 793-835.

- Trautwein, W; McDonald, TF & Tripathi, O: Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. *Pflügers Arch*, 1975; **354**: 55-74.

- Tritthart, H; Luedcke, Bayer, R Stierle, H & Kaufmann, R: Right ventricular hypertrophy in the cat. An electrophysiological and anatomical study. *J Mol Cell Cardiol*, 1975; **7**: 163-174.

- Tseng, GN: Calcium current restitution in mammalian ventricular myocytes is modulated by intracellular calcium. *Circ Res*, 1988; **63**: 468-482.

- Tseng, GN & Hoffman, BF: Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res*, 1989; **64**: 633-647.

- Tseng, GN: Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel. *Am J Physiol*, 1992; **262**: C1056-1068.

- Umemura, K; Zierhut, W; Rudin, M; Novosel, D; Robertson, E; Pedersen, B & Hof, RP: Effect of Spirapril on left ventricular hypertrophy due to overload in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**: 375-381.

- Unger, T & Gohlke, P: Converting inzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 146-158.

- Urata, H; Healy, B; Stewart, RW; Bumpus, FM & Husain, A: Angiotensin II receptors in normal and failing human hearts. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989; **69**: 54-66.

- Urata, H; Healy, B; Stewart, RW; Bumpus, FM & Husain, A: Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res*, 1990; **6**: 883-890.
- Van Gilst, WH; Tio, RA; Van Wijngaarden, J; Graeff, PA & Wesseling, H: Effects of converting enzyme inhibitors on coronary flow and myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **19**(suppl 5): S134-S139.
- Vaughan, DE & Pfeffer, MA: Angiotensin converting enzyme inhibitors and cardiovascular remodeling. *Cardiovasc Res*, 1994; **28**: 159-165.
- Walsh, KB: Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C. *Molecular Pharmacol*, 1991; **40**: 342-346.
- Wang, Z; Fermini, B & Nattel, S: Repolarization differences between guinea pig atrial endocardium: evidence for a role of  $I_{to}$ . *Am J Physiol*, 1991; **260**: H1501-1506.
- Wang, Z; Fermini, B & Nattel, S: Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier  $K^+$  current similar to  $Kv1.5$  cloned channel currents. *Circ Res*, 1993; **73**: 1061-1076.
- Wangler, RD; Peters, KG; Marcus, ML & Tomanek, RJ: Effects of duration and severity of arterial hypertension and cardiac hypertrophy on coronary vasodilator reserve. *Circ Res*, 1982; **51**: 10-18.
- Watanabe, T; Delbridge, J; Bustamante, JO & McDonald, TF: Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res*, 1983; **52**: 280-290.
- Watanabe, T; Rautaharju, P & McDonald, TF: Ventricular action potential, ventricular extracellular potentials, and ECG of guinea pig. *Circ Res*, 1985; **57**: 362-373.
- Weber, JR: Left ventricular hypertrophy: its prime importance as a controllable risk factor. *Am Heart J*, 1988; **116**: 272-279.
- Webster, MWI; Fitzpatrick, MA; Nicholls, MG; Ikram, H & Wells, JE: Effect of enalapril on ventricular arrhythmias in congestive heart failure. *N Eng J Med*, 1985; **56**: 566-569.
- Winwgrad, S & Shane, AM: Calcium flux and contractility in guinea-pig atria. *J Gen Physiol*, 1962; **45**: 371-394.
- Wier, WG & Isenberg, G: Intracellular  $[Ca^{2+}]$  transients in voltage clamped cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch*, 1982; **392**: 284-290.
- Woodward, B; & Zakaria, MNM: Effect of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1985; **17**: 485-493.
- Xu, X & Best, PM: Decreased transient outward  $K^+$  current in ventricular myocytes from

acromegalian rats. *Am J Physiol*, 1991; **260**: H935-H942.

- Yang, XL; Samaja, M; English, E; Benatti, P; Tarantola, M; Cardace, G; Motterlini, R; Micheletti, R & Bianchi: Hemodynamic and metabolic activities of propionyl-L-carnitine in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; **20**: 88-98.

- Yue, DT & Marbán, E: A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflügers Arch*, 1988; **413**: 127-133.

- Zak, R: Development and proliferation capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res (suppl II)*, 1974; **34-35**: 17-26.

- Zhang, K; Harvey, RD; Barrington, PL; Schackow, TE; Basset, AL & Ten Eik, RE: Transient outward current ( $I_{to}$ ) in normal and hypertrophied cat right ventricular myocytes. *Biophys J*, 1991a; **59**: 559a.

- Zhang, K; Harvey, RD; Martin, RL; Basset, AL & Ten Eik, RE: Inward rectifying K current in normal and hypertrophied cat right ventricular myocytes. *Biophys J*, 1991b; **59**: 279a.

- Zierhut, W & Zimmer, HG: Triiodothyronine-induced changes in function, metabolism and weight of the rat heart: effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic blockade. *Basic Res Cardiol*, 1989

- Zierhut, W; Zimmer, HG & Gerdes, AM: Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res*, 1991; **69**: 609-617.

- Zweier, JL; Flaherty, JT & Weisfeld, ML: Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 1404-1407.

- Zygmunt, AC & Gibbons, WR: Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*, 1991; **68**: 424-437.